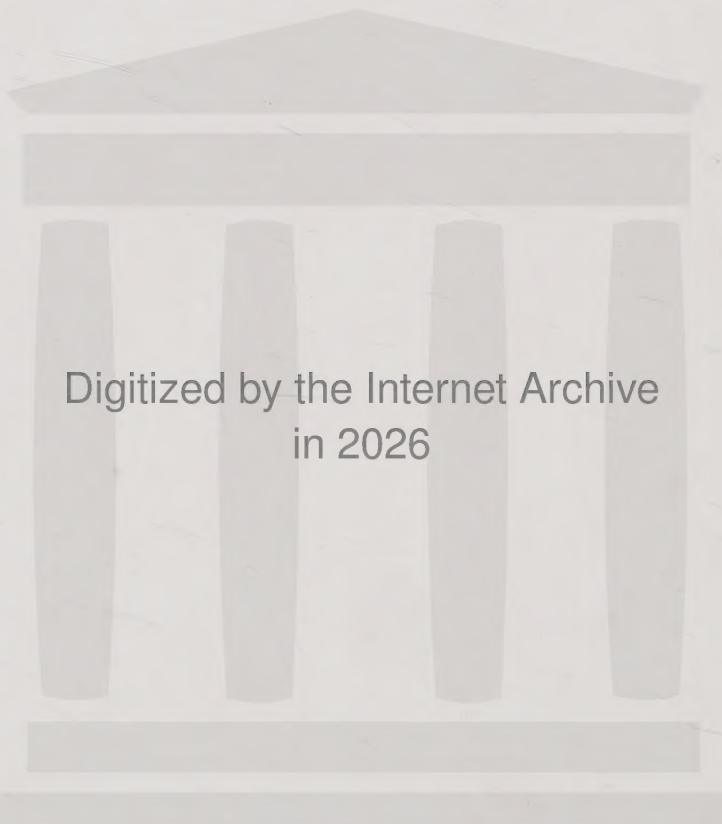


**Versuche zum Nachweis
der immunologischen Toleranz
mittels der Jerne-Technik**

Werner Schmidt

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551911_0032

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Dr. W. Brendel

Versuche zum Nachweis der immunologischen Toleranz
mittels der Jerne-Technik

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Werner Schmidt
aus
München

1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.Dr. W. Brendel

Mitberichterstatter: Priv.- Doz. Dr. W. Land

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.1975



Meinen Eltern

1. Einleitung	1
2. Meine Eltern	2
3. Meine Kindheit	3
4. Meine Jugend	4
5. Meine Ausbildung	5
6. Meine Berufswahl	6
7. Meine Familie	7
8. Meine Freunde	8
9. Meine Hobbys	9
10. Meine Zukunft	10
11. Meine Eltern	11
12. Meine Kindheit	12
13. Meine Jugend	13
14. Meine Ausbildung	14
15. Meine Berufswahl	15
16. Meine Familie	16
17. Meine Freunde	17
18. Meine Hobbys	18
19. Meine Zukunft	19
20. Meine Eltern	20
21. Meine Kindheit	21
22. Meine Jugend	22
23. Meine Ausbildung	23
24. Meine Berufswahl	24
25. Meine Familie	25
26. Meine Freunde	26
27. Meine Hobbys	27
28. Meine Zukunft	28
29. Meine Eltern	29
30. Meine Kindheit	30
31. Meine Jugend	31
32. Meine Ausbildung	32
33. Meine Berufswahl	33
34. Meine Familie	34
35. Meine Freunde	35
36. Meine Hobbys	36
37. Meine Zukunft	37
38. Meine Eltern	38
39. Meine Kindheit	39
40. Meine Jugend	40
41. Meine Ausbildung	41
42. Meine Berufswahl	42
43. Meine Familie	43
44. Meine Freunde	44
45. Meine Hobbys	45
46. Meine Zukunft	46
47. Meine Eltern	47
48. Meine Kindheit	48
49. Meine Jugend	49
50. Meine Ausbildung	50
51. Meine Berufswahl	51
52. Meine Familie	52
53. Meine Freunde	53
54. Meine Hobbys	54
55. Meine Zukunft	55
56. Meine Eltern	56
57. Meine Kindheit	57
58. Meine Jugend	58
59. Meine Ausbildung	59
60. Meine Berufswahl	60
61. Meine Familie	61
62. Meine Freunde	62
63. Meine Hobbys	63
64. Meine Zukunft	64
65. Meine Eltern	65
66. Meine Kindheit	66
67. Meine Jugend	67
68. Meine Ausbildung	68
69. Meine Berufswahl	69
70. Meine Familie	70
71. Meine Freunde	71
72. Meine Hobbys	72
73. Meine Zukunft	73
74. Meine Eltern	74
75. Meine Kindheit	75
76. Meine Jugend	76
77. Meine Ausbildung	77
78. Meine Berufswahl	78
79. Meine Familie	79
80. Meine Freunde	80
81. Meine Hobbys	81
82. Meine Zukunft	82
83. Meine Eltern	83
84. Meine Kindheit	84
85. Meine Jugend	85
86. Meine Ausbildung	86
87. Meine Berufswahl	87
88. Meine Familie	88
89. Meine Freunde	89
90. Meine Hobbys	90
91. Meine Zukunft	91
92. Meine Eltern	92
93. Meine Kindheit	93
94. Meine Jugend	94
95. Meine Ausbildung	95
96. Meine Berufswahl	96
97. Meine Familie	97
98. Meine Freunde	98
99. Meine Hobbys	99
100. Meine Zukunft	100

Inhalt

	Seite
A. Einleitung	1
B. Methodik	3
I. "direkte" Technik	3
a. Standardtechnik	3
b. Poly I:C als Adjuvans	6
c. Ersatz von Hammelerythrozyten durch Hundeerythrozyten	6
d. Hundelymphozyten als Effektorzellen, Hammelerythrozyten als Indikatorzellen	8
II. "indirekter" Test	10
a. Pferde IgG als Antigen, Chromchlorid als kuppelndes Agens	10
b. "Passive" Immunlyse mit Chromchlorid als kupplendem Agens	13
c. Durchführung einer "passiven" Hämagglu- tination	15
d. Austestung einer Antiserumreihe	18
III. Transferversuche mit immunisierten Zellen	18
a. Transplantation als Restitution von be- strahlten Tieren	18
b. Austestung des günstigsten Immunisie- rungsschemas für die Milzzelltransplan- tation	19
c. Transplantation von Milzzellen vorbehandelter Mäuse auf bestrahlte Mäuse	19
d. Individuelle Doppelstudie	20
IV. Bestimmung des Antikörpertiters gegen Pferde IgG	23
C. Ergebnisse	24
I. "direkte" Technik	24
a. Standardtechnik	24

II

	Seite
b. Poly I:C als Adjuvans	26
c. Hunderythrozyten anstelle von Schaferythrozyten als Targetzellen	27
d. Hundelymphozyten als Effektorzellen, Schaferythrozyten als Targetzellen	29
II. "indirekter" Test	31
a. Austestung der verschiedenen Immunisierungsschemata	31
b. Ergebnis der "passiven" Impulse	33
c. Ergebnis der "passiven" Hämagglutination	36
d. Ergebnis der Austestung einer Antiserumreihe	36
III. Transplantationsergebnisse	38
a. Bestimmung des günstigsten Zeitpunktes für Challenge bzw. Boosterung bei transplantierten Mäusen	38
b. Austestung verschiedener Immunisierungsschemata	39
c. Ergebnis des ersten Hauptversuches	40
d. Ergebnis des zweiten Hauptversuches (indiv. Doppelstudie)	42
IV. Bestimmung des Antikörpertiters gegen Pferde IgG	47
D. Diskussion	52
a. Der Plaque-Forming-Assay	52
b. Nachweis einer immunologischen Toleranz mittels des Plaque-Forming-Assay	56
c. Transplantationstoleranz	58
d. Toleranzinduktion im erwachsenen Organismus	59
e. Transfer von sensibilisierten bzw. toleranten Zellen auf normale Empfänger	60

	Seite
E. Zusammenfassung	62
F. Literatur	63

A. Einleitung

Die von Jerne, Nordin und Henry (35,36) sowie von Ingraham und Bussard (32, 33) (1964) entwickelte Antikörper-Plaque-Technik gilt als Standardtechnik zum Nachweis einzelner antikörperbildender Zellen in den lymphoiden Organen von Maus, Ratte und Kaninchen.

Bei den antikörperbildenden Zellen handelt es sich um Lymphozyten. Die von diesen freigesetzten Antikörper gehören entweder der IgM-Klasse an, die mittels der "direkten" Methode oder der IgG-Klasse an, die in der "indirekten" Methode nachgewiesen werden können.

Diese Technik kann noch weiter ausgedehnt werden, indem die Indikatorzellen z.B. mit Hilfe verschiedener Methoden 1) durch Chromierung oder 2) durch Bis-diazo-benzidin mit verschiedenen Antigenen gekoppelt werden, z.B. zum Nachweis antikörperbildender Zellen gegen Humanalbumin oder IgG von Kaninchen. Das Ergebnis ist der sogenannte Plaque:



Abb. 1: Photomikroskopische Aufnahme eines Plaques (aus Jerne et al.: Plaque Forming Cells: Methodology and Theory, Transplant.Rev.1974)

Es handelt sich dabei um ein blasses, durch lysierte Erythrozyten entstandenes Areal, in dessen Mitte sich die antikörperbildende Zelle befindet. Dieser Hämolysehof hebt sich gut von den noch intakten Erythrozyten der Umgebung ab.

Die Jerne-Plaque-Technik hat den unzweifelhaften Vorteil, daß sie die Erkennung, Auszählung und das Studium antikörperbildender Zellen erlaubt, selbst wenn sie sich nur ein paar unter Millionen von Zellen, die keine Antikörper gegen das spezifische Target sezernieren, befinden!

Die experimentelle und klinische Anwendung heterologer Immunseren und deren schnelle Elimination durch Antikörper war der Hintergrund zu Versuchen, in denen diese Technik so modifiziert wurde, daß eine Sensibilisierung der Versuchstiere nach AlG-Gabe und die danach einsetzende Antikörperbildung nachgewiesen werden konnte.

Besonderes Interesse gilt dabei Vorgängen bei Versuchen zur Induktion einer Immuntoleranz in Tieren.

Die nachfolgenden Untersuchungen umfassen daher folgende Teile:

1. Entwicklung und Standardisierung des Testes für Pferde IgG
2. Sensibilisierung von Mäusen gegen Pferde IgG
3. Induktion einer Immuntoleranz gegen Pferde IgG in der Maus
4. Transferversuche zum definitiven Beweis der Toleranz
5. Adjuvanseffekte mit Poly I:C
6. Versuch der Sensibilisierung von Hunden gegen SRBC und Durchführung des Plaque-Testes nach Gewinnung der Hundelymphozyten mittels der Ficoll-Methode.

B. Methodik

I. "direkte" Technik

a. Standardtechnik

Tiermaterial:

Als Versuchstiere dienten NMRI* Mäuse, weiblich, 8-12 Wochen alt, 20-25g schwer.

Immunisierungsschema:

Mäuse wurden mit 4×10^8 gewaschenen Sheep Red Blood Cells (SRBC) i.p. immunisiert. An den Tagen 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 6 töteten wir die Mäuse durch zervikale Dislokation.

Präparation der Milzzellen:

Mäusen wurde die Milz entnommen und in MEM*** unter Verwendung von Plastik- oder Drahtnetzen geschabt. Die dadurch freiwerdenden einzelnen Milzzellen wurden mit einer 17-Nadel aspiriert und anschließend durch gedoppelte Gaze gefiltert. Daraufhin wurden die Zellen in einer Neubauerzählkammer gezählt, auf 2×10^6 Zellen/0,1 ml eingestellt und bis zur weiteren Verwendung in Eiswasser bei 4°C gehalten. Zum Aufziehen der Zellen wurde eine Leukopipette verwendet: Die Zellen wurden auf Marke 0,5, mit 3% Essigsäure anschließend bis Marke 11 aufgezogen, 2 Minuten geschüttelt und dann in die Zählkammer eingefüllt (200 fache Verdünnung).

Versuchsablauf:

Vor Tötung der Mäuse wurden stabilisierte Hammelerys** in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen; die Zellen wurden dann auf 4×10^8 /ml eingestellt und im Eiswasserbad aufbewahrt.

* NMRI Mäuse: Fa. Bäumler, Wolfratshausen

** SRBC: stabilisiert, Behring Werke

*** MEM: Minimal Essential Medium with Hank's salt (10x), Gibco Cat. No 156

Vorgewärmte 10 ml Zentrifugenröhrchen (im Wasserbad von 37°C) wurden mit je 2 ml Deckagar (siehe unter Lösungen) beschickt; dazu gab man unter Verwendung je einer 100-Eppendorffmikropipette 0,1 ml Zellsuspension dazu, schüttelte kräftig und fügte unmittelbar danach 0,1 ml Hammelerysuspension dazu.

Beide, Deckagar und MEM, wurde auf Plastikpetrischalen^{*}, die mit 10 ml Bodenagar^{**} (siehe unter Lösungen) bedeckt wurden, gegossen und durch kreisende Bewegungen gleichmäßig verteilt. Die Petrischalen sollten auf einer völlig ebenen Unterlage liegen!

Dann wurden die Platten 1 Stunde lang im Brutschrank bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von Meerschweinchenkomplement^{***} wiederum 1 Stunde im Brutschrank bei 37°C gehalten. Daraufhin wurden die Plaques im Gegenlicht aufgesucht und ausgezählt!

Folgende Materialien und Lösungen hatten sich als ideal erwiesen:

- A) Sea Plaque Agarose
mci biomedical, division of marine colloide inc. p.c.
box 748 rockland maine
- B) Hepes-Puffer (pH 8,1) ^{****}
- C) Deae Dextran ^{*****}
- D) Agar Purum (Behring Werke) ^{**}

Herstellung der Lösungen:

- 1) MEM-Lösung: 10 ml MEM (10,) + 40 ml Aqua destillata
- 2) Deae Dextran: 1 g Deae Dextran in 100 ml Aqua dest.
gelöst = 1%

* Plastikpetrischalen: 94/16, steril, oberflächenbehandelt: Fa. Greiner Nürtingen

** Agar Purum: Behring Werke

*** Meerschweinchenkomplement: Travenol-Komplement 1:10 verdünnt mit NaCl.

**** Hepes-Puffer: Fa. Roth

***** Deae Dextran: Pharmacia Uppsala, Schweden.

- 3) Hepes Puffer (pH 8,1): 23,83 g Hepes (Fa. Roth), in
60,00 ml Aqua dest. gelöst,
dann Zugabe von
11,00 ml 5 n NaOH.

Sollte der pH von 8,1 noch nicht erreicht sein, so wurde er durch weitere Zugabe von 5n NaOH eingestellt.
Danach wurde Aqua dest. auf 150 ml aufgefüllt.

4) Deckagar:

Komponente 1:

- 0,7 g Sea Plaque agarose
- + 46 ml Aqua dest.
- + 4 ml Deae Dextran 1% kochen, bis die
Lösung ganz klar war.

Komponente 2:

- 10 ml MEM (10x)-Lösung + 40 ml Aqua dest.,
diese Lösung mit Hepes-Puffer (s. 3) auf
pH 7,3 einstellen.
Warmstellen im Wasserbad von 37°C.

Erst unmittelbar vor dem Pipettieren wurden Komponente 1 und 2 gemischt.

5) Bodenagar

Der Bodenagar wurde einen Tag vor dem eigentlichen Versuch gegossen:

1,4 g Agar purum (Behring Werke) wurden in 100 ml Medium gegeben:

10 ml MEM (10x) + 90 ml Aqua destillata, mit Hepes Puffer auf pH 7,4 eingestellt, zum Sieden gebracht und je 10 ml davon pro Platte ausgegossen. Nach 10 Minuten war der Agar fest und wurde im Kühlschrank - Deckel nach unten - gelagert.

Am Versuchstag wurden die Petrischalen dachziegelartig im Brutschrank vorgewärmt, um die Entstehung von Kondenswasser auf der Plattenoberfläche zu vermeiden!

6) Meerschweinchenkomplement

Travenol-Meerschweinchenkomplement wurde 1:10 mit Kochsalz verdünnt.

b. Poly I:C^{*} als Adjuvans:

NMRI Mäuse, 8-12 Wochen alt, weiblich, wurden zusätzlich zu den SRBC (4×10^8 /ml) mit 400yg des synthetischen Polynukleids Poly IC (Behring Werke) i.p. immunisiert. 2,3,4,5 und 6 Tage nach Immunisierung wurde wie beim Standardverfahren verfahren (gleiche Zahlen für "Layer": 2×10^6 Milzzellen/0,1 ml und 4×10^8 SRBC/0,1 ml).

c. Ersatz von SRBC durch DRBC:

Anstatt SRBC wurden im Plaque-Test auch DRBC (Dog Red Blood Cells) eingesetzt. Folgende Punkte differieren vom normalen Plaque-Test mit SRBC, Mäuse wurde dabei mit 4×10^8 DRBC/ml i.p. immunisiert. 0,2 ml Heparin/10 ml Hundevollblut wurde 3x in physiologischer NaCl gewaschen.

Am 4. Tag nach Immunisierung (Immunisationstag = 0. Tag) wurden die Mäuse getötet.

Für die zellhaltige Agarschicht wurden statt 4×10^8 /0,1 ml 2×10^8 /0,1 ml verwendet. Der Grund für die niedrigere Erythrozytenzahl liegt in der unterschiedlichen Blutkörperchengröße:

Gleiche Erythrozytenkonzentration würde zur Agglutination der Hundeerythrozyten führen; sie wurden zur weiteren Verwendung bei Zimmertemperatur gehalten. Bei der Austestung des Deckagars (Komponente 1) stellte sich heraus, daß der "Sea-plaque-agar" zusammen mit "Deae Dextran" die Agglutination der Hundeerythrozyten fördert und damit die Entstehung von Plaques verhindert. In Vorversuchen wurden deshalb verschiedene Agarsorten ausgetestet:

- 1) Sea plaque agarose = S.P.
- 2) Deae Dextran = D.D.

* Poly I:C Fa. Boehringer, Mannheim

- 3) Oreo Agarose* = O.
 4) Rotalgenagarose** = R
- A) S.P.+D.D.+Hundeerys ergab bei der erforderlichen Konzentration von 2×10^8 Erys/0,1 ml (durch Austestung ermittelt) eine starke Agglutination, ebenso bei alleiniger Verwendung von S.P. !
- B) O + D.D. + 2×10^8 Erys/0,1 ml ergab ebenfalls starke Verklumpung!
- C) R. + / - D.D. führte ebenso zur Agglutination!
- D) Sehr gute "Layer" wurden erhalten, wenn Oreo ohne D.D. als Komponente 1 verwendet wurde (0,7g Oreo in 50 ml Aqua dest.)!

Die Mäusemilzzellen wurden nicht auf Eis gestellt!
 Zentrifugenröhrchen wurden in 48°C Wasserbad vorgewärmt!
 Bedecken der Plastikpetrischale mit 10 ml Bodenagar war nicht nötig!

Anstelle von Meerschweinchenkomplement wurde Kaninchenkomplement (1 : 10 mit Na Cl verdünnt) verwendet!

Das rasche Festwerden des Agars machte ein zügiges Ausgießen erforderlich.

Nach Komplementzugabe wurde 2 Stunden inkubiert, dann die Plaques ausgezählt!

Reduzierung des Deckagars:

Außerdem wurde versucht, die Menge des Deckagars zu reduzieren, und zwar von 2 ml auf 1,5 ml, um dadurch die Diffusion der von der antikörperbildenden Zelle sezernierten Antikörper zu erleichtern.

* Oreo Agarose: Behring Werke

** Rotalgenagarose: Fa. Roth

d. Plaque-Test im Hundesystem, Effektorzellen = Hundelymphozyten, SRBC als Indikatorzelle:

Anstatt Mäuselymphozyten wurden Hundelymphozyten in den Plaque-Test eingeführt. Die Separation der Lymphozyten wurde wie folgt nach der Ficoll-Methode durchgeführt:

Heparinisiertes Vollblut (0,3 - 0,4 ml Heparin/20 ml Blut) wurde einem mit Hammelerythrozyten immunisierten Hund entnommen. Der Hund wurde nach folgendem Schema immunisiert:

Tag 1: 1 ml gepackte = 3x gewaschene Hammelerys + 1 ml komplettes Freund'sches Adjuvans s.c.

Tag 3: 1 ml gepackte Hammelerys s.c.

Tag 5: 1 ml gepackte Hammelerys s.c.

Tag 7: 1 ml gepackte Hammelerys + 1 ml komplettes Freund'sches Adjuvans s.c.

Tag 14: 1 ml gepackte Hammelerys s.c.

Tag 21: 1 ml gepackte Hammelerys s.c.

Frühestens 7 Tage nach dem letztem Bostern sollte Blut zum ersten Male gewonnen werden.

Das Blut wurde vorsichtig über Ficoll-Isopaque* (7 ml Ficoll/10 ml heparinisiertes Blut) in 10 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet und 17 Minuten bei 2700 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Mit einer Pasteurpipette wurden die fast reinen Lymphozyten am chemischen Graduenten abgesaugt und in MEM (Eagle) with Hank's salts (Gibco), das durch Hepespuffer (pH 8,1, siehe Standardmethode) auf einen pH von 7,6 eingestellt wurde, gegeben (pH 7,6 bei Hunden günstiger als pH 7,3). Danach wurden die Lymphozyten bei 1200 Umdrehungen/Minute 10 Minuten lang abzentrifugiert, der Überstand weggegossen und die Zellen erneut in MEM 10 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgegossen. Dieser Vorgang wiederholte sich noch ein drittes Mal. Das auf diese Methode gewonnene, gereinigte

* Ficoll-Isopaque-Lösung, D=1,077: Fa. Pharmacia, GmbH, Frankfurt/Main

Lymphozytensediment wurde in etwa 2 ml MEM mittels einer Pasteurpipette aufgewirbelt; die Hundelymphozyten wurden sodann auf $2 \times 10^6/0,1$ ml eingestellt (Methodik siehe unter "Präparation der Milzzellen").

Versuchsablauf:

SRBC wurden mit physiologischer NaCl 3x gewaschen und auf 4×10^8 Erys/0,1 (Tabelle 1), 3×10^8 Erys/0,1 (Tabelle 2) oder auf 2×10^8 Erys/0,1 (Tabelle 3) eingestellt. Statt Sea plaque agarose wurde Oreo agarose, 0,7g in 50 ml aqua dest. zum Kochen gebracht und ins Wasserbad bei 48°C gestellt, wo bereits mehrere 10 ml Zentrifugenröhrchen vorgewärmt waren. Bei Verwendung von Plastikpetrischalen (94/16, steril, oberflächenbehandelt: Fa. Greiner) war Ausgießen mit Bodenagar (Herstellung siehe Standardmethode) nicht unbedingt nötig.

Wie bei der Standardmethode beschickte man die vorgewärmten Zentrifugenröhrchen mit je 2 ml Deckagar und gab mittels zweier Ependorffmikropipetten* je 0,1 ml Hammelerythrozytensuspension und 0,1 ml Hundelymphozyten je Zentrifugenröhrchen dazu (zuerst die Hundelymphozyten), goß alles zusammen auf die Plastikpetrischale und verteilte schnell durch kreisende Bewegungen.

Dann wurden die Platten 1 Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Als Komplementquelle diente Meerschweinchenkomplement (M), Hundekomplement (H) und Kaninchenkomplement (K). Die Inkubationszeit wurde variiert (1 oder 2 Stunden nach Komplementzugabe), desgleichen die Komplementkonzentration (1 : 10, 1 : 5).

* Ependorffmikropipetten: Fa. Ependorff

II. "indirekter" Plaque-Test (Pferde IgG als Antigen und CrCl_3 als kuppelndem Agens):

Wie schon in der Einleitung angedeutet, kann man die Indikatorzellen (z.B. Schaferythrozyten) mit Hilfe verschiedener Methoden mit z.B. Proteinen kuppeln.

a. Immunisierungsschema:

NMRI Mäuse, 8-12 Wochen alt, weiblich, wurden nach verschiedenen Schematas immunisiert:

Schema 1: Tag 0 0,1 mg IgG Pferd + Freund'sches Adjuvans*
(A) = 0,2 ml i.p., Tag 2, 8 und 15 Boostern mit
je 1,0 mg = 1,0 ml IgG Pferd i.p.

Schema 2: Tag 0 0,1 mg IgG Pferd + 0,2 ml Freund'sches Adjuvans s.c., Boostern an den Tagen 2, 8 und 15
mit jeweils 1 mg IgG Pferd i.p.

Schema 3: Tag 0, 5 und 8 Immunisierung mit jeweils 1,0 mg
IgG Pferd i.p.

Schema 4: Tag 0 1,0 mg IgG s.c., Tag 5 und 8 Boostern mit
weiteren 1,0 mg IgG Pferd i.p.

Schema 5: 4x s.c. mit je 1,0 mg IgG = 1,0 ml an den Tagen
0, 5, 10 und 15

Schema 6: 4x i.p. mit je 1,0 mg IgG = 1,0 ml zur selben Zeit
wie Schema 5

Schema 7: 4x i.v. mit je 1,0 mg IgG = 1,0 ml, Zeit wie oben

Schema 8: Tag 0 1,0 mg IgG Pferd = 0,5 ml + 0,5 ml Freund'sches Adjuvans, Tag 5 und 10 1,0 mg IgG Pferd =
1,0 ml i.p.

* Freund'sches Adjuvans: Difco Laboratories, Detroit in Michigan.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
T 0	0,1 mgP +0,2 mlA	0,1 mgP +0,2 mlA	1,0 mgP i.p.	1,0 mgP s.c.	1,0 mgP s.c.	1,0 mgP i.p.	1,0 mgP i.v.	1,0 mgP +0,5 mlA
T 2	1,0 mgP i.p.	2,0 mgP i.p.	∅	∅	∅	∅	∅	∅
T 5	∅	∅	1,0 mgP i.p.	1,0 mgP i.p.	1,0 mgP s.c.	1,0 mgP i.p.	1,0 mgP i.p.	1,0 mgP i.p.
T 8	1,0 mgP i.p.	1,0 mgP i.p.	1,0 mgP i.p.	1,0 mgP i.p.	∅	∅	∅	∅
T 10	∅	∅	∅	∅	1,0 mgP s.c.	1,0 mgP i.p.	1,0 mgP i.v.	1,0 mgP i.p.
T 15	1,0 mgP i.p.	1,0 mgP i.p.	∅	∅	1,0 mgP s.c.	1,0 mgP i.p.	1,0 mgP i.v.	1,0 mgP i.p.

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der einzelnen Immunisierungsschemata

(Schema = S), Tag = T, Freund'sches Adjuvans = A, Pferde IgG = P)

Versuchsablauf:

Stabilisierte Hammelerythrozyten wurden 3x in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zu 0,4 ml gewaschenen, konzentrierten Erythrozyten kamen 0,4 ml Antigen = 20 mg elektrophoretisch gereinigtes Pferde IgG* und 0,1 ml $\text{CrCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}^{**}$ sowie 0,3 ml physiologische Kochsalzlösung. Diese Mischung wurde durch eine "passive Immunlyse" und eine "passive Hämagglutination" ausgetestet. Nach 4 Minuten bei Zimmertemperatur wurde die Reaktion gestoppt, indem 5 ml kalte physiologische NaCl dazugegeben wurde. Danach wurde bei 800 G/Minute 8 Minuten lang gewaschen. Der Überstand wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, der Niederschlag etwas aufgeschüttelt und wiederum 5 ml kalte NaCl dazugegeben und 8 Minuten bei 800 G/Minute abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt.

Danach wurde der Niederschlag in 7,6 ml 0,1% Gelatinelösung gelöst. Diese Gelatine-Erythrozytenlösung darf höchstens 2 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten werden.

Danach wurden die Milzzellen gewonnen (wie bei der Standardmethode) und auf $2 \times 10^6 / 0,1 \text{ ml}$ eingestellt.

Zentrifugenröhrchen wurden mit 2 ml Deckagar beschichtet; sie wurden vorher im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt. Dazu gab man mit zwei Ependorffmikropipetten je Röhrchen

0,1 ml Milzzellsuspension, die gut aufgeschüttelt wurde und

0,125 ml Erythrozytensuspension.

Der Inhalt des Zentrifugenröhrchens wurde nun in Plastikpetrischalen, die mit 3 ml Bodenagar bedeckt waren, gegossen und durch kreisende Bewegungen gleichmäßig verteilt. Die Platten standen ungefähr 10 Minuten. Dann wurde 1 Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert, Meerschweinchenkomplement

* Pferde IgG: Behring Werke AG

** Herstellung einer CrCl_3 -Stammlösung: Eine 0,0375 M Lösung in dest. Aqua wird in einer dunklen Flasche bei 4°C aufbewahrt und mit 0,9% NaCl verdünnt.

dazugegeben und erneut 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Plaques wurden im Gegenlicht aufgesucht und ihre Zahl bestimmt. Im Gegensatz zur Standardmethode wurde das Meer-schweinchenkomplement 1:10 mit Veronalpuffer* verdünnt. Dieser wurde seinerseits 1:4 mit Aqua destillata verdünnt.

b. "Passive Immunlyse" mit Chromchlorid als kuppelndem Agens:

Wie oben erwähnt, wurde die für die "indirekte Methode" mit CrCl_3 als kuppelndem Agens und Pferde IgG als Antigen sowie Hammelerythrozyten als Targetzellen gewonnene ideale Mischung dieser 3 Komponenten mittels der "passiven Immunlyse" ausgetestet. 3 solcher Lösungen wurden nach Peruca et al. ausgetestet:

- 1) 20 mg Antigen = Pferde IgG = 0,4 ml Antigen
0,4 ml 3x gewaschene Hammelerythrozyten

$$0,1 \text{ ml } \text{CrCl}_3 + 0,3 \text{ ml } \text{NaCl} = \underline{0,4 \text{ ml.}}$$

Diese Mischung wurde nach Vorschrift von Sweet and al. behandelt; die mit Pferde IgG beladenen Hammelerythrozyten (0,4 ml) wurden mit 7,6 ml 0,1% Gelatine verdünnt. Dadurch ergab sich eine 5% Erythrozytensuspension.

- 2) 10 mg Antigen = Pferde IgG = 0,2 ml Antigen
0,2 ml 3x gewaschene Hammelerythrozyten

$$0,1 \text{ ml } \text{CrCl}_3 + 0,1 \text{ ml } \text{NaCl} = \underline{0,2 \text{ ml.}}$$

Ähnlich wie oben wurde eine 5% Erythrozytensuspension zubereitet; dazu nahm man 0,2 ml behandelte Hammelerythrozyten und 3,8 ml 0,1% Gelatinelösung.

* Veronalpuffer: Herstellung siehe Kabat and Mayer's Experimental Immunchemistry, 2nd Ed., Charles C. Thomas, Springfield, III., 1961.

3) 1 mg Antigen = Pferde IgG = 0,2 ml Antigen = 0,02 ml
 Pferde IgG + 0,18
 ml Na Cl
0,2 ml 3x gewaschene Ham-
 melerythrozyten

0,1 ml CrCl_3 + 0,1 ml Na Cl = 0,2 ml.

Wie bei Punkt 2) wurde nun eine 5% Erythrozytensuspension hergestellt. Diese Lösungen wurden mit 5% Pferde IgG verdünnt. Man erhielt dadurch 2,5% Suspension (0,5 ml Erythrozytensuspension + 0,5 ml Pferde IgG = 2,5% Lösung); diese Zellkonzentration von 2,5% wurde im Versuch angewandt, da sie optimale Empfindlichkeit bei einer spektrophotometrischen Wellenlänge von 541 mμ ergab. Von dieser Suspension wurde 0,2 ml mit entweder 0,2 ml Anti IgG oder mit Pferde AlG als Antigen behandelten Hammelerythrozyten, 0,2 ml Anti AlG gemischt!

Die Antiseren wurden mit Pferde IgG verdünnt.

Je 12 Zentrifugenröhrchen wurden für IgG und AlG vorbereitet; diese Röhrchen wurden im Wasserbad von 37°C alle 5 Minuten bis zu einer Gesamtzeit von insgesamt 25 Minuten geschüttelt. Danach wurden sie eine halbe Stunde ins Eisbad gestellt. Dann fügte man 1 ml 20% Kaninchenkomplement hinzu, das mit Veronal- oder Phosphatpuffer verdünnt worden war und ließ die Röhrchen 1 Stunde im Wasserbad bei 37°C schütteln. Schließlich wurde der Inhalt des Röhrchens 15 Minuten lang bei 2500 Umdrehungen/Minute bei 5°C abzentrifugiert und der Überstand abgegossen; dieser blieb bis zur Erreichung der Zimmertemperatur stehen. Sein Hämoglobingehalt wurde im Beckmannphotometer* bei 541 nm abgelesen. Zu jedem Röhrchen bereitete man je 2 Kontrollen vor:

Kontrolle 1: CrCl_3 behandelte Hammelerythrozyten mit Pferde IgG, Komplement, aber ohne Antikörper!

Kontrolle 2: CrCl_3 behandelte Hammelerythrozyten mit Pferde IgG und Antikörper, aber mit hitzeinaktiviertem Komple-

* Beckmannphotometer; Fa. Beckmann

ment!

Die optimale Dichte jedes Kontrollröhrchens wurde von der Dichte ihrer korrespondierenden Teströhre abgezogen!

c. Durchführung einer "passiven Hämagglutination"

Zur Prüfung der Effizienz der Bindung von Pferde IgG an Hammelerythrozyten mittels Chromchlorid wurde neben der "passiven Immunlyse" eine "passive Hämagglutination" ausgeführt.

Folgende Materialien sind für die "passive Hämagglutination" nötig:

- 1) Serum: Es wurde bei 56°C 30 Minuten inaktiviert.
- 2) Hammelerythrozyten: die 3x mit NaCl gewaschen wurden.
- 3) Taninsäure: 5 mg Taninsäuresubstanz in 200 ml 0,9% NaCl lösen.
- 4) Phosphatpuffer: 1,45 g KH_2PO_4
 7,60 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 4,8 g Na Cl mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und auf pH 7,4 einstellen.
- 5) 1% Kaninchenserumlösung: Kaninchenserum 30 Minuten bei 56°C inaktivieren; 1 ml auf 100 ml 0,9% Na Cl.
- 6) Proteinbeladung der Erythrozyten an Pferde IgG.

Als Kontrolle wurden tanierte und tanierte, zusätzlich mit Pferde IgG als Antigen beladene = sensibilisierte Hammelerythrozyten genommen.

Tanierung der Erythrozyten:

Die angegebenen Mengen sind für 5 Reihen a 10 Röhrchen in 50 ml Plastikbechern anzusetzen:

- | | |
|------|-------------------------|
| 10,0 | ml NaCl |
| 5,0 | ml Taninsäure |
| 5,0 | ml Phosphatpuffer |
| 0,25 | ml Erythrozytensediment |

Das Erythrozytensediment wurde tropfenweise unter leichtem Schütteln zugegeben und der Ansatz 10 Minuten bei Zimmertemperatur oder bei 37°C stengelassen; danach wurde bei 1000 Umdrehungen/Minute 5 Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit Phosphatpuffer einmal gewaschen, wieder abzentrifugiert und nun mit ca. 1 ml Phosphatpuffer aufgeschüttelt. Davon wurden 0,25 ml tanierte Erythrozyten in 18 ml 1% Kaninchenserumlösung gegeben, 10 Minuten stehen gelassen, 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen/Minute abzentrifugiert und anschließend das Sediment in 13 ml 1% Kaninchenserumlösung aufgeschüttelt.

Diese Lösung wurde in die vorbereiteten Kontrollserumreihen eingesetzt.

Sensibilisierung der tanierten Erythrozyten

5,0 ml n/100 HCl

10,0 ml Phosphatpuffer

0,5 ml Proteinlösung (Pferde IgG)

gut mischen und von dieser Lösung

12,0 ml nehmen, dazu

6,0 ml NaCl

0,25 ml tanierte Erythrozyten.

Die Erythrozyten wurden tropfenweise unter leichtem Schütteln zugegeben und 10 Minuten bei Zimmertemperatur stengelassen, dann 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen/Minute abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 18 ml 1% Kaninchenserumlösung gegeben, 10 Minuten stengelassen, abzentrifugiert und in 13 ml der oben erwähnten 1% Lösung aufgeschüttelt. Diese Lösung wurde in die vorbereiteten Serumreihen eingesetzt.

Hauptansatz:

Serum von 2 Mäusen, die 3x i.p. mit Pferde IgG immunisiert worden waren (IgG-Antiserum) wurde bei 56°C eine halbe Stunde inaktiviert.

Eine Verdünnungsreihe a 10 Röhrchen wurde hergestellt und für jedes Serum 2 Reihen: 1) Kontrollreihe mit tanierten

Hammelerythrozyten

- 2) Verdünnungsreihe mit sensibilisierten Erythrozyten vorbereitet:

-	0,25 ml	0,25	0,25	0,25....	Phosphatpuffer
0,25 ml	0,25 ml	-	-	-	Serum
0,25 ml	0,25 ml	0,25	0,25	0,25....	vorbehandelte Erythrozyten (tanierte, sensibilisierte)

Die Röhrchen wurden gut geschüttelt und 6-18 Stunden (über Nacht) stehen gelassen.

Es wurde makroskopisch abgelesen. Die Kontrollseren müssen negativ sein, d.h. ein kleiner runder Erythrozytenknopf in der Mitte des Röhrchens entstanden sein; ein ausgefranster Erythrozytenring bedeutet positive Reaktion.

Die Titer gelten ab 1:8 als positiv!

Gegenüber der Kontrolle ergaben sich bei der Durchführung einer "passiven Hämagglutination" mit chromierten Hammelerythrozyten folgende Unterschiede:

- 1) Im Hauptansatz wurde anstelle von Phosphatpuffer 0,1% Gelatine in NaCl verwendet.
- 2) Pferde IgG wurde nach der Methode von Sweet and Welborn mittels Chromchlorid an 3x mit NaCl gewaschenen Hammelerythrozyten gekuppelt (Mengenangaben und genaue Durchführung siehe oben unter Methodik).
- 3) 0,4 ml chromierte Hammelerythrozyten wurden mit 0,1% Gelatine lange verdünnt, bis die Farbe beider Erythrozytensuspensionen (der tanierten und der chromierten) gleich war.

Ein Leerwert mit chromierten Hammelerythrozyten wurde mitgeführt. Die chromierten Erythrozyten wurden nicht mit dem Antigen Pferde IgG beladen.

d. Austestung einer Antiserumreihe:

Weiterhin wurde noch eine Antiserumreihe (Anti-y-Globulin vom Pferd) ausgetestet (Antigen: Pferd IgG). Dafür wurde die in der "passiven Immunlyse" als optimal gefundene Lösung 1 (0,4 ml Antigen, 0,4 ml Hammelerythrozyten, 0,1 ml CrCl_3 + 0,3 ml NaCl) verwendet.

Als Nullwerte wurden 1. CrCl_3 -behandelte Hammelerythrozyten mit Antigen (IgG) und Komplement, aber ohne Antikörper
 2. CrCl_3 -behandelte Hammelerythrozyten mit Antigen (IgG) und Antikörper (Anti-y-Globulin), aber mit inaktiviertem Kaninchenkomplement genommen.

Das Antiserum wurde folgendermaßen verdünnt:

1:1 = 0,3 ml

1:2 = 0,3 ml Pferde IgG+0,3 ml Anti-Globulin (Pferd) usw. (wie bei einer Hämagglutination).

III. Transferversuche mit immunisierten Zellen

a) Transplantation als Restitution von bestrahlten Tieren

1 Tag nach Bestrahlung mit 750 R (22 Minuten, 17 Sekunden, 60 cm Abstand bei 0,8 mm Kupferfilter, 180 kV und 18 mA) wurden Milzzellsuspensionen von unbestrahlten Mäusen i.v. in die Schwanzvene transferiert.

9 Tage nach der Milzzellentransplantation wurde zum ersten Mal die Leukozytenzahl aus dem Blut aus der Schwanzvene einer Maus bestimmt. Da die Restitution des weißen Blutbildes zu diesem Zeitpunkt noch nicht zufriedenstellend war, wurde am 16. Tag nach Transplantation zusammen mit der Erythrozytenzahl erneut die Leukozytenzahl bestimmt. Beim zweiten Kontrollversuch wurden nur 5×10^6 Milzzellen transferiert. Damit

wurde die Zahl der Todesfälle aufgrund von Lungenembolie infolge größerer Verklumpungstendenz der stark konzentrierten Milzzellen gesenkt.

10 NMRI Mäuse, weiblich, im Alter von 8-12 Wochen, die am Tag zuvor 750 R erhielten (letale Dosis), wurde in die Schwanzvene 5×10^6 Milzzellen gespritzt. Das Trinkwasser der Mäuse enthielt 1% Penicillin-Streptomycin.

Am 16. Tag nach der Transplantation von Milzzellen der unbehandelten NMRI Mäuse wurde aus der Schwanzvene Blut abgenommen und gezählt.

b. Immunisierungsschemata:

1. Vorversuch:

Je 13 Mäuse erhielten an den Tagen 0,5,10 und 15 je Tag 1 mg Pferde IgG. Eine Gruppe bekam diese Antigenmenge 4 mal in 5-tägigen Abständen i.p., die andere i.v. und die dritte i.p. 5 Tage nach der letzten Boosterung wurde je eine Maus getötet, die Milz entnommen und der Plaque-Test durchgeführt.

2. Vorversuch:

Mäuse wurden am Tag 0 mit 1 mg Pferde IgG s.c. am Tag 5 und 10 jeweils mit 1 mg Pferde IgG i.p. immunisiert. Außerdem wurden ebenfalls Mäuse 3x i.p. mit der gleichen Antigendosis und an den gleichen Tagen immunisiert.

c. Transplantation von Milzzellen vorbehandelter Mäuse auf bestrahlte Mäuse:

20 NMRI Mäuse, 8-12 Wochen, weiblich, wurden mit 750 R bestrahlt. Einen Tag später erhielten diese Milzzellen unterschiedlich immunisierter Mäuse.

Gruppe 1: 4 mal in 5-tägigen Abständen s.c. immunisierte Mäuse (Immunisierungsschema: Tag 0,5,10 und 15 je 1 mg Pferde IgG s.c.; 5 Tage Pause nach der letzten Boosterung, dann

Tötung der Mäuse und Milzentnahme).

Gruppe 2: Durch einmalige subkutane und zweimalige i.p. Applikation immunisierte Mäuse (Immunisierungsschema: Tag 0 1mg Pferde IgG (auf 0,5 ml eingestellt) + 0,5 ml Freund'sches Adjuvans s.c., am Tag 5 und 10 je 1mg Pferde IgG ohne Freund'sches Adjuvans).

Gruppe 3: "tolerante" Mäuse:

Zur Toleranzinduktion wurde die von Land und Mitarbeiter (40) am Menschen und Hund beschriebene Methode verwendet: 6 Tage vor Versuchsbeginn i.p. Injektion von 10 mg Pferde IgG/kg Maus das mit 100 000x g ultrazentrifugiert wurde, am Tag 13 erneute i.p. Injektion von 30 mg ultrazentrifugiertem Pferde IgG/kg Maus.

Von Gruppe 1 und 2 wurden n=5, von Gruppe 3 n=10 Mäuse zur Transplantation genommen.

5 bzw. 10 Tage nach der letzten Boosterung wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die so gewonnenen Milzzellen wurden zur Hälfte zur Transplantation, zur anderen Hälfte für den Plaque-Test verwendet. Am 16. Tag nach Transplantation wurde die Leukozytenzahl kontrolliert. Die Erythropoese der Kontrollmäuse wurde 3 Tage später zusätzlich zu den Leukozyten kontrolliert. Die "sensibilisierten" Mäuse wurden "geboostert", die "toleranten" Mäuse "herausgefordert" (Challenge) und zwar durch subkutane Applikation von 1mg Pferde IgG = 0,5 ml und 0,5 ml Freund'schem Adjuvans. 7 Tage später wurde der Plaque-Test durchgeführt.

d. Individuelle Doppelstudie

Im Gegensatz zum ersten Versuch wurden einzelne Milzen übertragen und die Tiere individuell gekennzeichnet. Ein weiterer Unterschied bestand darin, daß nur Milzzellen der Mäuse verwendet wurden, die nach dem Schema 5 (4 x s.c. von 1mg Pferde IgG an den Tagen 0,5,10 und 15) immunisiert wurden.

10 NMRI Mäuse, 8-10 Wochen alt, weiblich, die einen Tag vor

Transplantation mit 750 R bestrahlt worden waren, erhielten je Maus 5×10^6 Milzzellen/0,5 ml i.v. in die Schwanzvene von den Mäusen, die nach dem Immunisierungsschema 5 gespritzt wurden (5. Tag nach der letzten Boosterung). Dabei erhielten die durch Ohrenmarken gekennzeichneten Mäuse folgende

Milzen (Tabelle 2):

Maus Nr. 151	Milz 1	Maus Nr. 156	Milz 6
Maus Nr. 152	Milz 2	Maus Nr. 157	Milz 7
Maus Nr. 153	Milz 3	Maus Nr. 158	Milz 8
Maus Nr. 154	Milz 4	Maus Nr. 159	Milz 9
Maus Nr. 155	Milz 5	Maus Nr. 160	Milz 10

Tabelle 2: Übertragung der Einzelmilzen auf die durch Ohrenmarken individuell gekennzeichneten Mäuse.

Am selben Tag erhielten 10 Mäuse, die ebenfalls einen Tag zuvor mit 750 R bestrahlt wurden, 5×10^6 Milzzellen/0,1 ml in die Schwanzvene von solchen Mäusen, bei denen eine Toleranz gegen Pferde IgG induziert wurde.

Die durch Ohrenmarken gekennzeichneten Mäuse erhielten folgende

Milzen (Tabelle 3):

Maus Nr. 161	Milz 11	Maus Nr. 166	Milz 16
Maus Nr. 162	Milz 12	Maus Nr. 167	fiel aus
Maus Nr. 163	Milz 13	Maus Nr. 168	Milz 18
Maus Nr. 164	Milz 14	Maus Nr. 169	fiel aus
Maus Nr. 165	Milz 15	Maus Nr. 170	Milz 20

Tabelle 3: Übertragung der Einzelmilzen auf die durch Ohrenmarken individuell gekennzeichneten Mäuse.

Zwei Tage später erhielten wiederum 10 Mäuse, die tags zuvor mit der letalen Dosis von 750 R bestrahlt wurden, je Maus 5×10^6 Milzzellen/0,5 ml in die Schwanzvene von solchen Mäusen, die nach dem Immunisierungsschema 5 (4x s.c.) gespritzt worden waren (7. Tag nach der letzten Boosterung). Die Transplantation der Milzzellen auf die bestrahlten Mäuse geschah in folgender Weise (Tabelle 4):

Maus Nr. 141	Milz 1	Maus Nr. 146	Milz 6
Maus Nr. 142	Milz 2	Maus Nr. 147	Milz 7
Maus Nr. 143	Milz 3	Maus Nr. 148	Milz 8
Maus Nr. 144	Milz 4	Maus Nr. 149	Milz 9
Maus Nr. 145	Milz 5	Maus Nr. 150	Milz 10

Tabelle 4: Übertragung der Einzelmilzen auf die durch Ohrenmarken individuell gekennzeichneten Mäuse.

Zur Boosterung erhielten die Mäuse der "immunisierten" Gruppen je Maus 50 mg Pferde IgG/kg Maus und 0,5 ml Freund'sches Adjuvans subkutan! Zum Challenge der "toleranten" Mäuse wurde die oben angegebene Antigenmenge ebenfalls subkutan appliziert.

7 Tage nach Boosterung bzw. Challenge wurden die Mäuse getötet, entblutet (zur Gewinnung der Seren) und nach der üblichen Methode der Jerne-Plaque-Test durchgeführt.

Da die Zahl der sogenannten "toleranten" Mäuse gegenüber der der immunisierten zu niedrig war, wurde der Versuch wiederholt (3. Versuch).

10 Mäuse, die am Tag zuvor mit 750 R bestrahlt wurden, erhielten je Maus 5×10^6 Milzzellen/0,5 ml i.v. von solchen Mäusen, bei denen durch Applikation von Pferde IgG eine Toleranz induziert wurde, und zwar erhielten die durch Ohrenmarken gekennzeichneten Mäuse folgende Milzen (Tabelle 5):

Maus Nr. 201	Milz 1	Maus Nr. 206	Milz 6
Maus Nr. 202	Milz 2	Maus Nr. 207	Milz 7
Maus Nr. 203	Milz 3	Maus Nr. 208	Milz 8
Maus Nr. 204	Milz 4	Maus Nr. 209	fiel aus
Maus Nr. 205	Milz 5	Maus Nr. 210	Milz 10

Tabelle 5: Übertragung der Einzelmilzen auf die durch Ohrenmarken individuell gekennzeichneten Mäuse.

Zum "Challenge" am 16. Tag nach Transplantation wurde wiederum 50 mg Pferde IgG/kg Maus und 0,5 ml Freund'sches Adjuvans subkutan injiziert, 7 Tage später der Plaque-Test

nach den üblichen Kriterien durchgeführt.

IV. Bestimmung des Antikörpertiters gegen Pferde IgG:

Zur Bestimmung des Antikörpertiters gegen Pferde IgG wurden die Mäuse am Transplantationstag und 7 Tage nach Boosterung bzw. Challenge entblutet und ihr Serum gewonnen.

C. Ergebnisse:

I. Direkte Methode:

a. Standardtechnik (Variationen)

Zur Definition des optimalen Zeitpunktes des Standardtestes wurden 17 Mäuse mit 4×10^8 Schaferthrombozyten immunisiert.

Am Tag 0 und 1 wurden in Kontrollmäusen ($n=4$) ähnlich wie Tag 2 post injektionem zwischen 0 und 6 Plaques pro Platte (2×10^6 Milzzellen) gefunden. Am 3. Tag stieg die Anzahl der Antikörper sezernierenden Zellen um das 20-50-fache an (durchschnittlich 100 Plaques/ 2×10^6 Milzzellen), um am Tag 4 optimale Zahlen mit durchschnittlich 640 Plaques zu erreichen. Wurde am Tag 5 nur ein leichter Abfall der Plaques festgestellt, so ergab sich am Tag 6 ein signifikanter ($p < 0,025$) Abfall gegenüber Tag 4 auf durchschnittlich nur noch 300 Plaques. Die folgende Tabelle verdeutlicht das eben Gesagte:

2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag
M1: 1,0,1	M1: 126,145,126	M1: 724,752	M1: 720,724	M1: 345,372,388
M2: 1,6,4	M2: 94,108,91	M2: 624,441	M2: 404,436,360	M2: 326,372
M3: 2,1,6	M3: 66,70		Ms: 252,252	M3: 238,212,248
M4: 0,0,1	M4: 70,95			M4: 216,202,204
$\bar{x} 1,8 \pm 2,25$	$\bar{x} 99 \pm 27$	$\bar{x} 635 \pm 141$	$\bar{x} 450 \pm 200$	$\bar{x} 283 \pm 76$

Tabelle 6: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Maus pro Platte (2×10^6 Milzzellen) an verschiedenen Tagen nach Immunisierung mit 4×10^8 Schaferthrombozyten, $\bar{x} \pm s$.

Die Anzahl der Versuche erforderte Zellzahlen, die aus einer einzelnen Milz nicht erhalten werden konnten. Um den Einfluß der notwendigen "Poolung" zu untersuchen, wurden die Zellen von 3 Mäusen gemischt und in der gleichen Technik untersucht.

Die 14 Vorversuche zeigten, daß eine nicht signifikante Plaque-Differenz bestand. So war an den Plaquezahlen am Tag 0, 1 und 2 keinerlei Unterschied gegenüber den nur pro Einzelmaus erhaltenen festzustellen, während am Tag 3 nur ein Drittel der Werte der individuellen Austestung erzielt wurde. Die höchste Immunisierungsrate wurde eindeutig am Tag 4 beobachtet. Ein Absinken auf Tiefstwerte am Tag 6 war steiler als im Einzelversuch (siehe Tabelle 7):

n=8	n=3	n=2	n=1
Mäusemilzen ge- poolt (3. Tag)	Mäusemilzen ge- poolt (4. Tag)	Mäusemilzen ge- poolt (5. Tag)	Mäusemilzen gepoolt (6. Tag)
15, 20, 34, 31, 17, 22, 23, 18.	478, 489.	468, 656.	4, 4, 3, 2, 6.
10, 35, 18, 12, 15, 26, 18.	1416, 1364, 1272, 1336, 1526.	529, 600, 712	
106, 151.	276, 358, 428.		
24, 19, 20.			
14, 15, 8, 12, 4, 3.			
63, 109, 102, 100, 95.			
5, 6, 2, 1.			
31, 39.			
$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
$\bar{x} 34 \pm 37$	$\bar{x} 893 \pm 520$	$\bar{x} 593 \pm 97$	$\bar{x} 3,8 \pm 1,5$

Tabelle 7: Anzahl "plaque"bildender Zellen pro Mäusegruppe pro Platte (2×10^6 Milzzellen) an verschiedenen Tagen nach Immunisierung mit 4×10^8 Schaferythrozyten, $\bar{x} \pm s$.

In einem Einzelversuch konnte gezeigt werden, daß eine Erhöhung der Milzzellzahl pro Platte (4×10^6 gegenüber 2×10^6) eine Steigerung der Antikörper sezernierenden Zellen ergab (Tag 3):

Mäusemilzen gepoolt
(3. Tag)

191,170,243.

240,227,171,278.

Tabelle 8: Anzahl "plaque"bildender Zellen pro Platte (4×10^6 Milzzellen) am Tag 3 nach Immunisierung mit 4×10^8 Schafererythrozyten.

b. Poly I:C als Adjuvans:

Eine Steigerung der Antikörper sezernierenden Zellen gelang durch Zugabe von 400yg Poly I:C zum Zeitpunkt der Immunisierung mit Schafererythrozyten. Am 2. Tag post injektionem erhielt man eine Erhöhung der Plaquezahlen um fast das Fünffache (Mittelwert der Kontrolle 2, Mittelwert Poly I:C 10) während Tag 3 keinerlei Steigerung gegenüber Kontrollmäusen zeigte. Eine signifikante Steigerung der antikörperbildenden Zellen ergab Tag 4 und zwar von 640 Plaques/ 2×10^6 Milzzellen im Mittelwert auf ungefähr 1200 Plaques im Durchschnitt bei den Poly I:C Mäusen. Ähnlich Tag 3 war auch am Tag 5 eine Erhöhung der Antikörper bildenden Zellen zu sehen; am Tag 6 wurde nur eine geringe Zellzahldifferenz gefunden.

Die folgende Tabelle verdeutlicht diese Unterschiede:

Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
M1: 9,7,5.	M1: 70, 106.	M1: 1288,	M1: 424,	M1: 395,524,
M2: 2,2,4.	M2: 109,110,	1264,152,	476,452.	568.
M3: 11,25,14.	100.	M2:1080,	M2: 660,	M2: 676,612,
M4: 12,13,13.		1050.	720.	784.
				M3: 280,280,
				320,284,260,
				300.
$\bar{x} \ 10 \pm 6$	$\bar{x} \ 100 \pm 17$	$\bar{x} \ 1167 \pm 120$	$\bar{x} \ 546 \pm 134$	$\bar{x} \ 440 \pm 184$

Tabelle 9: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Maus pro Platte (2×10^6 Milzzellen) an verschiedenen Tagen nach Immunisierung mit 4×10^8 Schafer erythrozyten und gleichzeitiger Gabe von 400yg Poly I:C, $\bar{x} \pm s$.

c. Hundeerythrozyten anstelle von Schafer erythrozyten als Targetzellen:

Die am Tag 4 nach Immunisierung mit Hundeerythrozyten erhaltenen Plaquezahlen waren um etwa die Hälfte niedriger als die mit der Standardmethode erzielten. So ergab sich bei der Standardmethode im Mittelwert eine Plaquezahl von ungefähr $700/2 \times 10^6$ Milzzellen, hier von ungefähr 350.

Bei dieser Methode ist es ohne Unterschied, ob die Plastikpetrischale mit Bodenagar bedeckt ist oder nicht, oder ob das Kaninchenkomplement 1:10 oder 1:5 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt ist.

Die folgende Tabelle zeigt die Anzahl der Plaques am Tag 4 (Hundeerythrozyten als Targetzellen):

Tag 4 (Kaninchenkomplement 1:10 mit NaCl verdünnt)	Tag 4 (Kaninchenkomplement 1:5 mit NaCl verdünnt)
Maus 1: 728,348,428.	Maus 1: 532
Maus 2: 256,236,222.	Maus 2: 308
Maus 3: 132,436,256.	
Maus 4: 336,124,156.	
Maus 5: 648,521,548.	
$\bar{x} \ 352 \pm 195$	$\bar{x} \ 420 \pm 159$

Tabelle 10: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Maus pro
 Platte (2×10^6 Milzzellen) am Tag 4 nach Immuni-
 sierung mit 4×10^8 Hunderythrozyten, $\bar{x} \pm s$.

Niedrigere Plaquezahlen wurden erhalten, wenn nach einer Stunde Inkubation bei 37°C das 1:10 verdünnte Kaninchenkomplement abgegossen und dann 2ml 1:10 verdünntes Meer-
 schweinchenkomplement dazugegeben wurde (20, 24, 4 Plaques
 pro 2×10^6 Milzzellen); auch die Mäuse, die zusätzlich noch
 mit 400yg Poly I:C immunisiert wurden, zeigten nach dieser
 Methode nur einen geringfügigen Anstieg der PFC gegenüber
 den nur mit 4×10^8 gewaschenen Hunderythrozyten immunisier-
 ten Mäusen (36, 18 Plaques pro 2×10^6 Milzzellen).

Bei dem Versuch, statt 2ml nur 1,5 ml Deckagar zu verwenden,
 genügte von 5 Platten nur eine den Ansprüchen (272 Plaques/
 2×10^6 Milzzellen). Kontrollversuche mit Meerschweinchen-
 bzw. Hundekomplement zeigten schlechtere Ergebnisse als Ka-
 ninchenkomplement!

Folgende Abbildung zeigt die bei der "direkten" Plaquemetho-
 de erzielten Ergebnisse zum Vergleich (Abb. 2):

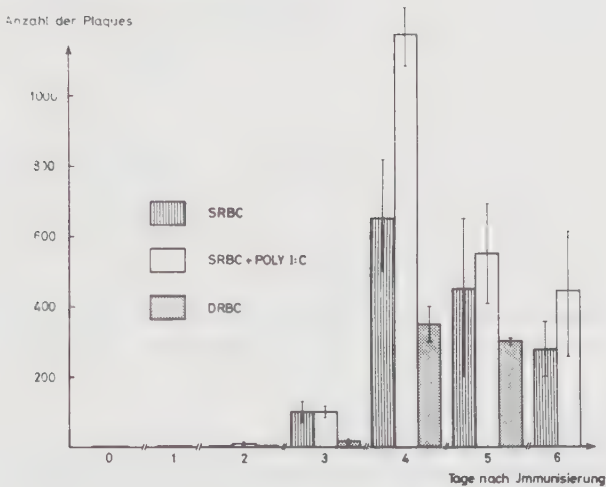


Abb. 2: Graphische Darstellung der bei der "direkten" Plaque-Technik in Einzelversuchen erzielten Plaquezahlen.
 SRBC = Hammelerythrozyten; DRBC = Hundeerythrozyten.
 Abszisse: Anzahl der Plaques/ 2×10^6 Milzzellen.
 Ordinate: Tage nach Immunisierung mit 1. SRBC.
 2. SRBC + Poly I:C, 3. DRBC, $\bar{x} \pm s$.

d. Hundelymphozyten als Effektorzellen, Schafererythrozyten als Indikatorzellen

Dabei wurde die Standardtechnik dahingehend variiert, daß Hundelymphozyten statt Mäuselymphozyten verwendet wurden. Es wurde 7 Tage nach der letzten Boosterung der Hunde mit Schafererythrozyten bei Verwendung von Meerschweinchenkomplement praktisch keinerlei Plaquebildung festgestellt (Tabelle 11):

4×10^8 SRBC/0,1 ml	3×10^8 SRBC/0,1 ml	2×10^8 SRBC/0,1 ml
2×10^6 Lymphozyten	3×10^6 Lymphozyten	3×10^6 Lymphozyten
2,3,3,0,1,1,1,0, 3,1,2,2.	0,0,0.	0,0,0.

Tabelle 11: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Platte pro Hund 7 Tage nach der letzten Boosterung mit Schafer erythrozyten (SRBC), Verwendung von Meerschweinchenkomplement.

Auch die Verwendung von Kaninchenkomplement anstelle von Meerschweinchenkomplement führte nicht zum Erfolg (Tabelle 12):

4×10^8 SRBC/0,1 ml	3×10^8 SRBC/0,1 ml	2×10^8 SRBC/0,1 ml
2×10^6 Lymphozyten	2×10^6 Lymphozyten	2×10^6 Lymphozyten
0,1,0,1,2.	0,0,0,0,0,0.	2,0.

Tabelle 12: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Hund pro Platte 7 Tage nach der letzten Boosterung mit Schafer erythrozyten, Verwendung von Kaninchenkomplement.

Plaquebildung bei Verwendung von Hundekomplement (Tabelle 13):

4×10^8 SRBC/0,1 ml	3×10^8 SRBC/0,1 ml	2×10^8 SRBC/0,1 ml
2×10^6 Lymphozyten	2×10^6 Lymphozyten	2×10^6 Lymphozyten
	1. Stunde Hundekompl.	
	2. " Kaninchenk.	
1,0,0,0,0,0,0,0,0.	2,5,4,6.	0,0,1,0,0,0,0,0.

Tabelle 13: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Hund pro Platte 7 Tage nach der letzten Boosterung mit Schafer erythrozyten, Verwendung von Hundekomplement.

II. Indirekte Methode:

a. Zur Austestung des günstigsten Immunisierungsschemas wurden mehrere Vorversuche durchgeführt. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. 2×10^6 Milzzellen/Platte ergaben bessere Resultate als 1×10^6 Milzzellen
2. 0,125 ml chromierte Hammelerythrozyten/Platte erwiesen sich als günstig!
3. Schema 4 (Tag 0 subkutane Applikation von 1,0 mg Pferde IgG, an den Tagen 5 und 8 i.p. Applikation von jeweils 1,0 mg Pferde IgG, 10 Tage nach der letzten Boosterung) und Schema 5 (4x s.c. Applikation von jeweils 1,0 mg Pferde IgG an den Tagen 0,5,10 und 15, 5 bzw. 7 Tage nach der letzten Boosterung) zeigten im Verhältnis zu den übrigen Schemata eine bessere Immunisierung und damit höhere Plaquezahlen. Die folgende Graphik stellt die einzelnen Schemata einander gegenüber und verdeutlicht das eben Gesagte: die Schemata 1 und 2 werden nicht dargestellt, da hier nur 1×10^6 Milzzellen statt 2×10^6 je Test verwendet wurden:

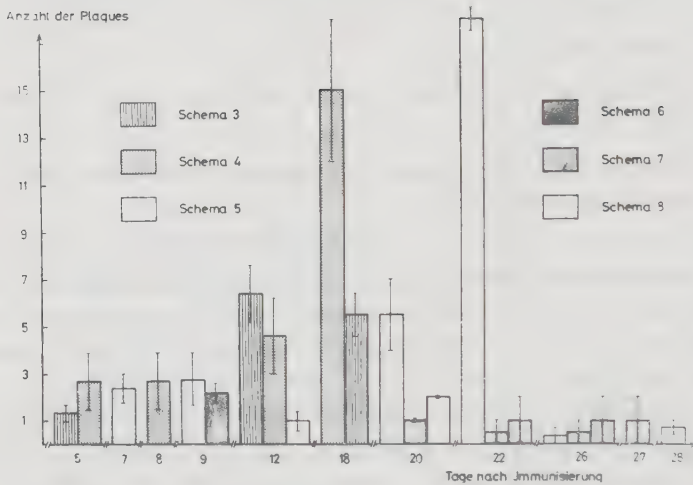


Abb. 3: Graphische Darstellung der bei der "indirekten" Plaque-Technik in Einzelversuchen erzielten Plaquezahlen.

Abszisse: Anzahl der Plaques/ 2×10^6 Milzzellen

Ordinate: Tage nach Immunisierung mit Pferde IgG

Immunisierungsschemata: 3, 4, 5, 6, 7 und 8 siehe Tabelle 1

$\bar{x} \pm \bar{s}_x$.

b. Ergebnis der "passiven" Immunlyse:

Für die "passive" Immunlyse wurden zwei Gruppen gebildet:

Gruppe 1: Antigen Pferde IgG

Gruppe 2: Antigen Pferde AlG

Von jeder Gruppe wurden 3 Lösungen ausgetestet und zwar mit der Antigendosis von 20 mg, 10 mg und 1 mg Pferde IgG bzw. AlG.

Es zeigte sich, daß Lösung 1 und 3 sowohl bei Gruppe 1 als auch bei Gruppe 2 die höchsten Extinktionswerte aufwiesen und zwar unabhängig davon, ob Kontrolle 1 oder Kontrolle 2 zugrundegelegt war.

Im einzelnen wurden folgende Extinktionen erzielt:

Gruppe 1:Lösung 1 (20 mg Pferde IgG):

Kontrolle 1: Anti AlG 0,265 E
Anti IgG 0,286 E

Kontrolle 2: Anti AlG 0,212 E
Anti IgG 0,225 E

Lösung 2 (10 mg Pferde IgG):

Kontrolle 1: Anti AlG 0,370 E
Anti IgG 0,260 E

Kontrolle 2: Anti AlG 0,271 E
Anti IgG 0,162 E

Lösung 3 (1 mg Pferde IgG) :

Kontrolle 1: Anti AlG 0,334 E
Anti IgG 0,315 E

Kontrolle 2: Anti AlG 0,280 E
Anti IgG 0,265 E

Gruppe 2:Lösung 1 (20 mg Pferde AlG):

Kontrolle 1: Anti AlG 0,388 E
Anti IgG 0,350 E

Kontrolle 2: Anti AlG 0,355 E
Anti IgG 0,316 E

Lösung 2 (10 mg Pferde AlG):

Kontrolle 1: Anti AlG 0,347 E
Anti IgG 0,315 E

Kontrolle 2: Anti AlG 0,192 E
Anti IgG 0,154 E

Lösung 3 (1 mg Pferde AlG):

Kontrolle 1: Anti AlG 0,392 E
Anti IgG 0,262 E

Kontrolle 2: Anti AlG 0,286 E
Anti IgG 0,162 E

Folgende Graphiken verdeutlichen diesen Zusammenhang
(Abb. 4 und 5):

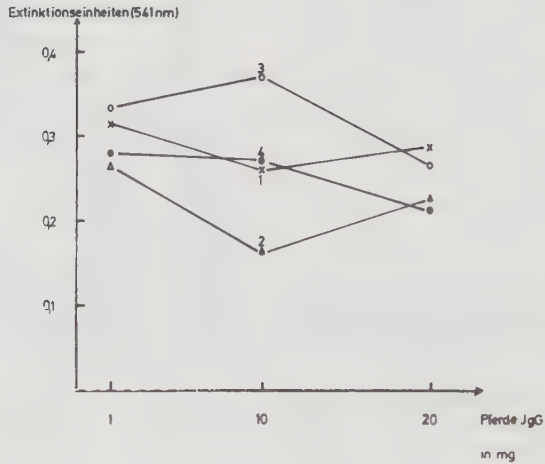


Abb. 4: Passive Immunlyse mit Pferde IgG als Antigen

Abszisse: Proteinmenge (Pferde IgG) in mg

Ordinate: Extinktion bei 541 nm (0,1 E=5 Kästchen)

Kurve 1: Extinktion Anti IgG, gegen Kontrolle 1 gemessen

Kurve 2: Extinktion Anti IgG, gegen Kontrolle 2 gemessen

Kurve 3: Extinktion Anti AlG, gegen Kontrolle 1 gemessen

Kurve 4: Extinktion Anti AlG, gegen Kontrolle 2 gemessen

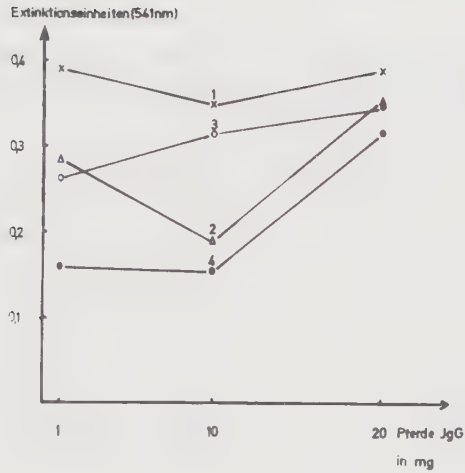


Abb. 5: Passive Immunlyse mit Pferde AlG als Antigen

Abszisse: Proteinmenge (Pferde AlG) in mg

Ordinate: Extinktion bei 541 nm (0,1 E=5 Kästchen)

Kurve 1: Extinktion Anti AlG, gegen Kontrolle 1 gemessen

Kurve 2: Extinktion Anti AlG, gegen Kontrolle 2 gemessen

Kurve 3: Extinktion Anti IgG, gegen Kontrolle 1 gemessen

Kurve 4: Extinktion Anti IgG, gegen Kontrolle 2 gemessen

Für die weiteren Versuche wurde die Lösung 1 verwendet, da sie genauer zuzubereiten ist als Lösung 3.

c. Austestung der Effizienz der Antigenbindung mit Chromchlorid an Hammelerythrozyten mittels der "passiven Hämagglutination":

Wie unter "Methodik" ausgeführt, wurde die "passive Hämagglutination" mit 1. Taninsäure als kuppelndem Agens und 2. mit Chromchlorid nach der Methode von Sweet and Welborn ausgeführt. Als Ergebnis blieb festzuhalten:

Die Belastung der mit Chrom behandelten Hammelerythrozyten mit Pferde IgG ergab einen Titer von 1:8, die Hämagglutination war also positiv; im Vergleich dazu waren die Erythrozytenreihen mit tanierten und sensibilisierten (tanierten) Erythrozyten sowie die chromierte Erythrozytenkontrollreihe ausnahmslos negativ!

d. Ergebnis einer Antiserumreihe:

Bei der Austestung eines Anti-y-Globulin-Serums vom Pferd (Antigen: Pferde IgG) wurden folgende Antikörper, gemessen in Extinktionseinheiten, erhalten (Nullwert 1 genommen, Tabelle 14):

Titer	Extinktion
1:1	0,204
1:2	0,050
1:4	0,018
1:8	0,014
1:16	0,013
1:32	0,015
1:64	0,014
1:128	0,015
1:256	0,010
1:512	0,010

Tabelle 14: Antikörpertiter eines Anti-y-Globulin-Serums vom Pferd, ausgedrückt in Extinktionseinheiten.

Graphisch läßt sich diese Antiserumreihe folgendermaßen darstellen (Abbildung 6):

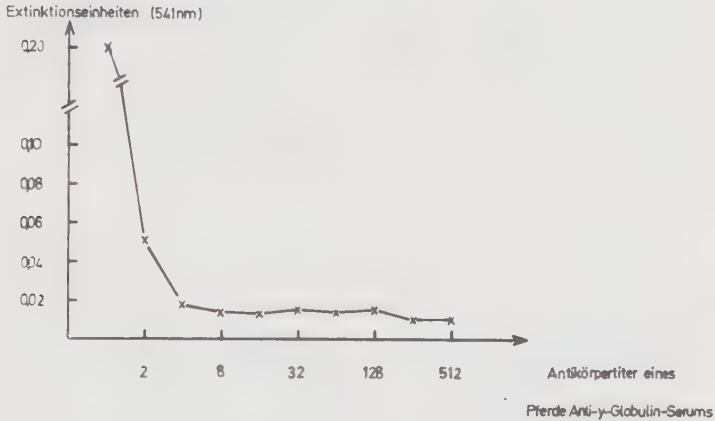


Abb. 6: Graphische Darstellung einer Antiserumreihe (Pferde Anti-y-Globulin-Serum)

Abszisse: Antikörpertiter (in Titerstufen) bei 541nm

Ordinate: Extinktion bei 541 nm (0,1 Extinktionseinheiten (E) = 10 Kästchen).

III. Transplantation:

a. Bestimmung des Zeitpunktes für Boosterung bzw. Challenge:

9 bzw. 16 Tage nach Milzzelltransplantation wurde Blut aus der Schwanzvene der Mäuse entnommen. Dabei zeigte sich, daß am 16. Tag nach Milzzelltransplantation über 50% des weißen Blutbildes restituiert war. Dieser Tag hatte sich also als idealer Zeitpunkt für Boosterung bzw. Challenge erwiesen.

Diese Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle verdeutlicht:

	Unbehandelte Maus	Bestrahlte und transplantierte Maus
Tag 9	Lymphozyten: 15600/mm ³ Granulozyten: 3600/mm ³ gesamt: 19200/mm ³	Lymphozyten: 800/mm ³ =5,1% Granulozyten: 200/mm ³ =5,5% gesamt: 2000/mm ³ =5,2%
Tag 16	Lymphozyten: 15600/mm ³ Granulozyten: 3600/mm ³ gesamt: 19200/mm ³	Lymphozyten: 12200/mm ³ =78,2% Granulozyten: 500/mm ³ =13,9% gesamt: 17200/mm ³ =89,6%

Tabelle 15: Zahl der Lymphozyten und Granulozyten bei transplantierten Mäusen 9 bzw. 16 Tage nach Milzzelltransplantation pro mm³ im Vergleich zu unbehandelten Mäusen in Prozentzahlen.

Von den im ersten Kontrollversuch gespritzten 9 Mäusen, die die Zellen von unbehandelten Mäusen in die Schwanzvene erhielten (Suspension eine ganze Milz), starben 3 Mäuse sofort an Lungenembolie, 5 Tage später weitere 2 Mäuse; 9 Tage nach Transplantation lebten noch 3 Mäuse, die letzte starb 37 Tage nach der Milzzelltransplantation!

Auch bei Reduktion der Anzahl der transplantierten Milzzellen auf 5×10^6 /Maus erwies sich der 16. Tag nach der i.v. Transplantation als optimaler Zeitpunkt (50% Restitution des weißen Blutbildes) für Boosterung bzw. Challenge, wie

folgende Tabelle beweist:

	Unbehandelte Maus	Bestrahlte und behandelte Maus
Tag 16	Lymphozyten: 7600/mm ³ Granulozyten: 1200/mm ³ gesamt: 8800/mm ³	Lymphozyten: 3400/mm ³ =44,7% Granulozyten: 1600/mm ³ =133,3% gesamt: 5000/mm ³ =56,8%

Tabelle 16: Anzahl der Lymphozyten und Granulozyten bei Mäusen, 16 Tage nach i.v. Transplantation von 5×10^6 Milzzellen/mm³ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen, in Prozentzahlen.

b. Austestung verschiedener Immunisierungsschemata:

Im ersten Vorversuch zeigte sich, daß die 4-malige s.c. Immunisierung mit jeweils 1,0 mg Pferde IgG an den Tagen 0,5,10 und 15,5 Tage nach der letzten Boosterung, der 4-maligen i.v. bzw. i.p. Immunisierung mit der gleichen Antigendosis überlegen war.

Die folgende Tabelle verdeutlicht diesen Zusammenhang:

4x s.c.	4x i.p.	4x i.v.
7,4.	1,1.	0,0.
$\bar{x} \ 5,5 \pm 2,12$	$\bar{x} \ 1,0 \pm 0$	$\bar{x} \ 0$

Tabelle 17: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Platte (2×10^6 Milzzellen) pro Maus, die durch verschiedene Immunisierungsschemata (s.c., i.p. und i.v.) gegen Pferde IgG sensibilisiert wurde, 5 Tage nach der letzten Boosterung, Tag 0,5,10 und 15 Immunisierung, $\bar{x} \pm s$.

Der 2. Vorversuch zeigte, daß 10 Tage nach der letzten Boosterung bei Antigengabe am Tag 0 (s.c.) und an den Tagen 5 und 10 (jeweils i.p.) von 1,0 mg Pferde IgG die größ-

te Plaquezahl erreicht wurde (Tabelle 18):

	Immunisierungsschema 1	Immunisierungsschema 2
Tag 5	1,2,5. $\bar{x}$ 2,66 $\pm$ 2,08	2,1,1. $\bar{x}$ 1,33 $\pm$ 0,58
Tag 8	0,0,0. $\bar{x}$ 0	4,1,3. $\bar{x}$ 2,66 $\pm$ 1,53
Tag 14	3,4,9,7,0. $\bar{x}$ 4,6 $\pm$ 3,50	6,9,3,9,5. $\bar{x}$ 6,40 $\pm$ 2,61
Tag 20	25,25,28,3,6,2. $\bar{x}$ 14,83 $\pm$ 12,35	3,5,3,6,8,8. $\bar{x}$ 5,50 $\pm$ 2,25

Tabelle 18: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Platte (2×10^6 Milzzellen) pro Maus, an verschiedenen Tagen nach Immunisierung mit Pferde IgG, Immunisierungsschema 1: Tag 0 1,0 mg s.c., an den Tagen 5 und 10 i.p. Applikation von jeweils 1,0 mg i.p. $\bar{x} \pm s$
Immunisierungsschema 2: i.p. Applikation von je 1,0 mg Pferde IgG an den Tagen 0,5 und 10, $\bar{x} \pm s$.

Ergebnis des Plaque-Testes am Tag der Transplantation

c. Hauptversuch:

Wie in der Einleitung beschrieben, wurden von der Gruppe 1 und 2 je 5 Tiere, von Gruppe 3 10 Mäuse zur Transplantation genommen. Am Transplantationstag wurde die eine Hälfte der Milzzellen zur Transplantation, die andere Hälfte für den Plaque-Test verwendet; dabei wurden folgende Plaquezahlen erzielt (Tabelle 19):

Immunisierte Mäuse		"tolerante" Mäuse	
Gruppe 1	Gruppe 2		
Maus 1: 0,1.	Maus 6: 3,3.	Maus 11: 0,1.	Maus 16: 1,0.
Maus 2: 0,2.	Maus 7: 0,4.	Maus 12: 7,2.	Maus 17: 0,0.
Maus 3: 0,0.	Maus 8: 1,1.	Maus 13: 0,0.	Maus 18: 1,0.
Maus 4: 2,2.	Maus 9: 2,0.	Maus 14: 0,4	Maus 19: 0,0.
Maus 5: 0,2.	Maus 10: 0,0.	Maus 15: 0,0.	Maus 20: 0,0.
$\bar{x} \pm s$ 1,15 $\pm$ 1,27		$\bar{x} \pm s$ 0,80 $\pm$ 1,77	

Tabelle 19: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Platte (2×10^6 Milzzellen) pro Maus am Tag der Transplantation, $\bar{x} \pm s$.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, war die Immunisierung nicht effektiv genug. Dagegen durchbrachen bei der Gruppe der sogenannten "toleranten" Mäuse nur 2 Tiere die Toleranz.

Bestimmung des weißen Blutbildes am 16. bzw. 19. Tag nach Transplantation mit zusätzlicher Kontrolle der Erythropoese

Bei den transplantierten Mäusen wurde am Tag 16 nach Transplantation zur Kontrolle die Leukozytenzahl, am Tag 19 zusätzlich noch die Erythropoese kontrolliert. Dabei zeigte sich eine über 50% Restitution des weißen Blutbildes, weiterhin ergaben sich günstige Erythrozytenzahlen wie folgende Tabelle 20 zeigt:

	Unbehandelte Maus	Tolerante Maus	Immunisierte Maus
Tag 16 (Leukozyten)	5200	6200	4600
Tag 19 (Leukozyten)	6400	8000	3600
Tag 19 (Erythrozyten)	$7,62 \times 10^6$	$7,35 \times 10^6$	$5,92 \times 10^6$

Tabelle 20: Anzahl der Leukozyten/mm³ bei "toleranten bzw. immunisierten Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen am Tag 16 und Tag 19, zusätzlich Anzahl der Erythrozyten am 19.Tag nach Transplantation.

Am Tag 19 wurde nun die Boosterung bzw. der Challenge durchgeführt, 7 Tage später die Mäuse getötet und der Plaque-Test durchgeführt.

Es zeigte sich, daß nur Gruppe 2 (Tabelle 20) eine Steigerung der antikörperbildenden Zellen zeigte und zwar von durchschnittlich 1,40 Plaques pro 2×10^6 Milzzellen auf durchschnittlich 5,17 Plaques. Nachfolgende Tabelle verdeutlicht dies (Tabelle 21):

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
0,0.	9,10.	0,5
1,1.	0,8.	1,0
0,1.	3,1.	0,1
0,3.		
$\bar{x} \ 0,75 \pm 1,04$	$\bar{x} \ 5,17 \pm 4,35$	$\bar{x} \ 1,17 \pm 1,94$

Tabelle 21: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Platte (2×10^6 Milzzellen) pro Maus, 7 Tage nach Boosterung (Gruppe 1 und 2) bzw. Challenge (Gruppe 3), $\bar{x} \pm s$.

d. Ergebnis des 2. Hauptversuches

Die Milzen von 10 Mäusen, die nach dem Immunisierungsschema 5,5 Tage nach der letzten Boosterung, gegen Pferde IgG sensibilisiert wurden, wurden auf letal bestrahlte NMRI Mäuse übertragen, weiterhin 10 Milzen von Mäusen, bei denen eine Toleranz induziert wurde. Die immunisierten Mäuse zeigten durchschnittlich 5 Plaques pro 2×10^6 Milzzellen gegenüber 1,93 Plaques bei den "toleranten" Mäusen, wie folgende Tabellen zeigen:

Milz 1: 2,1.	Milz 6: 0,0.
Milz 2: 0,0.	Milz 7: 0,1.
Milz 3: 0,0.	Milz 8: 2,10. $\bar{x} 4,9 \pm 12,15$
Milz 4: 31,34.	Milz 9: 2,0.
Milz 5: 0,0.	Milz 10: 1,1.

Tabelle 22: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Platte (2×10^6 Milzzellen) pro Maus am Transplantations- tag, Immunisierungsschema 5:
Tag 0,5,10 und 15 s.c. Applikation von Pferde IgG, $\bar{x} \pm s$.

Milz 11: 0,2.	Milz 15: 7,4.
Milz 12: 1,0.	Milz 16: 3,2.
Milz 13: 3,5.	Milz 18: 2,0. $\bar{x} 1,93 \pm 2,08$
Milz 14: 2,0.	Milz 20: 0,0.

Tabelle 23: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Platte (2×10^6 Milzzellen) pro Maus, bei der eine To- leranz induziert wurde, am Transplantations- tag, $\bar{x} \pm s$.

Weitere 10 Mäuse, die nach dem Schema 5 immunisiert wurden (Tag 0,5,10 und 15 je 1,0 mg Pferde IgG s.c.), im Vergleich zu vorhin aber 7 Tage nach der letzten Boosterung getötet wurden, zeigten am Transplantationstag durchschnittlich 3 Plaques/ 2×10^6 Milzzellen (Tabelle 24):

Milz 1: 2,1.	Milz 6: 1,4.
Milz 2: 7,6.	Milz 7: 0,4.
Milz 3: 4,9.	Milz 8: 1,2.
Milz 4: 1,1.	Milz 9: 2,0.
Milz 5: 3,1.	Milz 10: 1,5
$\bar{x} 2,84 \pm 2,50$	

Tabelle 24: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Platte (2×10^6 Milzzellen) pro Maus am Transplanta- tionstag, Immunisierungsschema: Tag 0,5,10 und 15 je 1,0 mg Pferde IgG s.c., 7 Tage nach der letzten Boosterung, $\bar{x} \pm s$.

Diese Tabelle verdeutlicht weiterhin, daß nur 50% der Mäuse immunisiert waren.

Von den Mäusen, die die Milzzellen von 4x s.c. immunisierten Mäusen erhalten hatten (5. bzw. 7. Tag nach der letzten Boosterung) starben insgesamt 7 Tiere, von den sogenannten "toleranten" Mäusen 3, insgesamt also 11 Mäuse. Am 19. Tag nach der Transplantation der Milzzellen wurde die Boosterung bzw. der Challenge durchgeführt. 7 Tage später ergaben sich bei der Gruppe der 4x s.c. immunisierten Mäuse, Transplantationstag 5. Tag nach der letzten Boosterung, 9,33 Plaques/2x10⁶ Milzzellen gegenüber 8,08 am Transplantationstag, bei der 2. Gruppe der immunisierten Mäuse (7. Tag nach der letzten Boosterung) 5,35 Plaques gegenüber 2,50 Plaques pro 2x10⁶ Milzzellen am Transplantationstag (Tabelle 25):

Plaques bei Mäusen, die die Milzzellen von 4x s.c. immunisierten Mäusen erhielten, 7 Tage nach der Boosterung, () Zahl der PFC am Transplantationstag			
Gruppe 1	35,37.	(31,47)	
	3,1.	(0,0)	
	1,4.	(10,2)	
	4,7.	(2,0)	Ø 9,33 [±] 12,60 (Ø 8,0 [±] 15,07)
	6,5.	(2,1)	
	3,6.	(1,1)	
Gruppe 2	10,5.	(9,4)	
	11,8.	(1,1)	
	4,3.	(5,1)	
	11,4.	(4,1)	Ø 5,35 [±] 3,34 (Ø 2,50 [±] 2,38)
	7,2.	(3,1)	
	4,3.	(2,1)	
	2,1.	(2,0)	

Tabelle 25: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Platte
(2x10⁶ Milzzellen pro Maus, 7 Tage nach der

letzten Boosterung,

Gruppe 1: Milzzellen von 4x s.c. immunisierten Mäusen, die 5 Tage nach der letzten Boosterung getötet wurden, $\bar{x} \pm s$.

Gruppe 2: Milzzellen von Mäusen, die 4x s.c. immunisiert wurden, Tötung 7 Tage nach der letzten Boosterung, $\bar{x} \pm s$.

In Klammern sind die Plaquezahlen des Transplantationstages aufgeführt.

Bei der Gruppe der Mäuse, die die Milzzellen von Toleranz induzierten Mäusen erhielten, zeigten sich praktisch keinerlei Unterschiede in der Plaquezahl am Transplantationstag und am 7. Tag nach Challenge (Tabelle 26):

"tolerante" Mäuse, () Zahl der PFC bei der Transplantation	
1,0.	(3,2)
1,2.	(0,2)
0,0.	(0,0)
1,0.	(1,0)
$\bar{x} 0,63 \pm 0,74$	$\bar{x} 1,00 \pm 1,19$

Tabelle 26: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Platte (2×10^6 Milzzellen) pro Maus, im Vergleich zur Zahl der PFC bei der Transplantation (in Klammern), 7 Tage nach Challenge, $\bar{x} \pm s$.

Da die Anzahl der Tiere, bei denen eine Toleranz induziert wurde, für die Statistik zu niedrig war, wurden nochmals 10 Mäuse tolerant gemacht. Dabei zeigte sich im Durchschnitt eine Plaquezahl von $1,39/2 \times 10^6$ Milzzellen (Tabelle 27):

Milz 1: 1,0.	Milz 6: 1,0.
Milz 2: 1,0.	Milz 7: 2,1.
Milz 3: 2,0.	Milz 8: 6,2.
Milz 4: 4,2.	Milz 9 fällt aus
Milz 5: 2,0.	Milz 10: 1,0.

Tabelle 27: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Platte (2×10^6 Milzzellen) pro Maus, bei denen eine Toleranz gegen Pferde IgG induziert wurde, am Transplantationstag.

Aus dieser Tabelle ist weiter ersichtlich, daß von 6 Mäusen nur 2 die Toleranz durchbrochen hatten.

7 Tage nach Challenge waren noch 3 von 9 Tieren tolerant, die übrigen hatte die Toleranz durchbrochen bzw. waren von Anfang an nicht tolerant gewesen (Tabelle 28):

"tolerante" Mäuse, () = Zahl der PFC bei Transplantation	
18,13.	(1,0)
1,2.	(1,0)
1,0.	(2,0)
1,2.	(0,2)
7,7.	(1,0)
1,2.	(4,2)
7,5.	(6,2)
6,4.	(2,1)
4,2.	(0,1)
$\bar{x} \ 4,61 \pm 4,67$	$\bar{x} \ 1,39 \pm 1,58$

Tabelle 28: Anzahl "plaque" bildender Zellen pro Platte (2×10^6 Milzzellen) pro Maus, der die Milzzellen einer tolerant gemachten Maus transplantiert wurden, 7 Tage nach Challenge, PFC am Transplantationstag in Klammern, $\bar{x} \pm s$.

Gesamtergebnis der durchgeführten Transplantationen

Von insgesamt 30 Mäusen, die die Milzzellen von 25 Tieren, die nach dem Schema 5 immunisiert wurden, erhielten, sowie von 5 Mäusen (nach Schema 8 gespritzt), zeigten 8 Tiere nach Boosterung eine signifikante ($p < 0,05$) Steigerung der antikörperbildenden Zellen sowie 2 Tiere, die Milzzellen von nach Schema 8 immunisierten Mäusen erhielten.

Von insgesamt 28 sogenannten "toleranten" Mäusen blieben 8 auch nach Challenge noch tolerant.

IV. Ergebnis der Austestung mehrerer Mäuseseren mittels der "passiven Hämagglutination"

Von der einzelnen Maus wurde einerseits die Milz zur Durchführung der intravenösen Milzzelltransplantation bzw. des Jerne-Plaque-Testes andererseits Serum zur Bestimmung des Antikörpertiters mittels der "passiven Hämagglutination" gewonnen.

Die pro Maus gefundenen Antikörpertiter korrespondieren selten mit den Plaquezahlen!

Die folgenden Tabellen stellen Antikörpertiter und Plaquezahl einander gegenüber; dabei sind zwei Gruppen zu trennen:

Gruppe 1: Plaquezahl bzw. Antikörpertiter von Mäusen, die individuell mit Ohrenmarken gekennzeichnet sind.

Gruppe 2: Plaquezahl bzw. Antikörper von nicht durch Ohrenmarken gekennzeichneten Mäusen am Transplantationstag (T) und 7 Tage nach Boosterung (B) bzw. Challenge (C) = Poolmäusen.

	Antikörpertiter		Plaques/Platte		
Nr.	gegen Pferde	IgG am	am		
	Tag T	Tag B	Tag T	Tag B	
	1	1:2	1:4	2/0	6/4
	2	1:8	-	0/0	-
	3	1:2	-	0/0	-
	4	-	1:2	31/47	35/37
	5	1:2	0	0/0	3/1
	6	0	-	0/0	-
	7	1:4	-	0/1	-
	8	0	1:4	2/10	4/1
Seren	9	0	-	2/0	7/4
	10	0	1:2	1/1	3/6
immuni-	11	0	-	2/1	-
	12	1:4	-	7/6	-
sierter	13	0	1:2	9/4	10/5
	14	0	0	1/1	8/11
Mäuse	15	0	0	3/1	7/2
	16	0	0	4/1	11/4
	17	0	-	4/0	-
	18	0	0	2/1	4/3
	19	1:4	1:8	2/0	2/1
	20	1:32	-	5/1	4/3

Tabelle 29: Antikörpertiter verglichen mit Plaquezahl von immunisierten Mäusen am Transplantationstag (T) und 7 Tage nach Boosterung (B); - bedeutet entweder Tod der Maus oder Verlust des Serums, Mäuse individuell mit Ohrenmarken gekennzeichnet.

Handelt es sich bei der oben genannten Gruppe um individuell markierte Mäuse, so wurden in der zweiten Gruppe zwar die Einzelmilzzellen auf die verschiedenen Mäuse übertragen, diese aber nicht mit Ohrenmarken gekennzeichnet, sodaß

ein direkter Vergleich zwischen Transplantationstag und Tag der Boosterung nicht möglich war; nur bei Maus 5 und 6 (Tag der Boosterung) korreliert Plaquezahl und Antikörpertiter (Tabelle 30):

	Nr.	Antikörpertiter gegen Pferde IgG am Tag T	Plaques/Platte am Tag T
	1	0	0/1
	2	0	0/2
	3	1:2	0/0
Seren im-	4	0	2/2
munisier-	5	0	0/2
ter	6	0	3/3
Mäuse	7	0	0/4
	8	1:2	1/1
	9	1:16	2/0
	10	1:16	0/0

Tabelle 30: Vergleich der Antikörpertiter mit der Plaquezahl am Transplantationstag bei immunisierten Mäusen, die nicht mit Ohrenmarken versehen wurden.

	Nr.	Antikörpertiter gegen Pferde IgG am Tag B	Plaques/Platte am Tag B
	1	1:8	0/0
	2	0	1/1
Seren im-	3	0	0/1
munisier-	4	0	0/3
ter	5	1:4	8/0
Mäuse	6	1:8	10/9
	7	0	0/0
	8	0	1/3

Tabelle 31: Vergleich der Antikörpertiter mit der Plaquezahl am Tag der Boosterung bei immunisierten Mäusen, die nicht mit Ohrenmarken gekennzeichnet waren.

Bei der Gruppe der toleranten, mit Ohrenmarken gekennzeichneten Mäusen zeigen die Mäuse Nr. 1, 2 und 15 korrelierende Werte zwischen Antikörpertiter und Plaquezahl, während die übrigen Mäuse signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede aufweisen (Tabelle 32):

	Nr.	Antikörpertiter gegen		Plaques/Platte	
		Pferde IgG am		am	
		Tag T	Tag C	Tag T	Tag C
Seren toleranter Mäuse	1	0	1:2	0/2	1/2
	2	0	0	1/0	1/0
	3	0	-	5/3	-
	4	0	-	2/0	-
	5	0	-	7/4	-
	6	1:2	0	3/2	1/0
	8	-	-	2/0	-
	10	-	1:2	0/0	0/0
	11	0	0	0/1	4/2
	12	0	1:4	1/0	1/2
	13	-	1:4	2/0	1/2
	14	0	1:4	4/2	1/2
	15	0	0	2/0	1/0
	16	1:2	1:8	1/0	18/13
	17	1:2	0	1/2	4/2
	18	1:2	1:8	6/2	7/5
	20	-	0	0/1	4/2

Tabelle 32: Antikörpertiter verglichen mit der Plaquezahl von toleranten Mäusen am Transplantationstag (T) und 7 Tage nach Challenge (C); - bedeutet entweder der Tod oder Verlust des Serums, Mäuse mit Ohrenmarken gekennzeichnet.

Wie schon bei der Gruppe der immunisierten Tiere wurde ebenso eine Gruppe von toleranten Tieren ausgetestet, bei denen wiederum die Mäuse nicht mit Ohrenmarken versehen waren,

sodaß ein Vergleich zwischen Transplantationstag und Tag des Challenge nicht möglich war (Tabelle 33):

Nr.	Antikörpertiter gegen Pferde IgG am Tag T	Plaques/Platte am Tag T
1	1:4	0/1
2	1:16	7/2
3	1:8	0/0
4	0	0/0
5	0	1/0
6	1:32	0/0
7	-	-
8	1:4	1/0
9	0	0/0
10	0	0/0

Tabelle 33: Vergleich der Antikörper mit der Plaquezahl am Transplantationstag bei toleranten Mäusen, die nicht mit Ohrenmarken versehen waren.

Nr.	Antikörper gegen Pferde IgG am Tag C	Plaques/Platte am Tag C
1	0	1/0
2	1:8	0/5
3	0	0/2

Tabelle 34: Vergleich der Antikörpertiter mit der Plaquezahl am Transplantationstag bei toleranten Mäusen, die nicht mit Ohrenmarken gekennzeichnet wurden.

D. Diskussion

Die Analyse von zellulären Vorgängen, die der Innumantwort zugrundeliegen, wurde vor allem durch die Entwicklung sensibler und zuverlässiger Methoden zur Bestimmung einzelner antikörperbildender Zellen erleichtert. Die durch Antigen induzierte Antikörpersynthese muß als Ergebnis eines Differenzierungsprozesses von lymphoiden Zellen angesehen werden, da die Precursor-Zellen solcher später aktiv sezernierender Zellen entweder keine oder nur minimale Antikörpermengen produzieren. Es darf als sicher angenommen werden, daß alle lymphoiden Zellen einem Differenzierungsprozeß unterliegen und zur Antikörpersekretion ausgerüstet werden. Auch im Thymus konditionierte Zelltypen haben eine Reaktivität gegen das Antigen und sind wahrscheinlich an einer begrenzten Antikörperbildung beteiligt. Sie bilden Antigenrezeptoren, die an der Zelloberfläche verankert bleiben und selten als Antikörper von der Zelloberfläche entlassen werden.

Um solche Zellvorgänge zu studieren, wurden Techniken entwickelt, mit denen es möglich ist, zwischen diesen beiden antikörperproduzierenden Zelltypen zu unterscheiden, und zwar solchen, die die Antikörper sezernieren und solchen, die die Antikörper auf ihrer Zelloberfläche binden. Für erstere wird der Plaque-Forming-Assay (35) herangezogen, für die zweite die Rosettenbildung (42).

a. Der Plaque-Forming-Assay

Analog zu den Plaque- oder Kolonietechniken in der Mikrobiologie wurde 1964 von Jerne, Nordin und Henry (35,36) sowie von Ingraham und Bussard (32, 33) die Agar-Plaque-Technik entwickelt. Ähnlich der Plaque-Technik, die ursprünglich zum Auszählen von Bakteriophagen entwickelt wurde, handelt es sich in beiden Fällen um die Sichtbarmachung einer winzigen biologischen Einheit durch einen Prozeß, der auf einen lokalen Bezirk beschränkt ist.

Wurde bei der ursprünglichen Methode eine kleine Anzahl von Viruspartikeln mit einer großen Menge "anfälliger" Bakterien in einer Agarschicht zusammengegeben und die Bakterien durch Phagen lysiert, so werden in unserem Fall lymphoide Zellen mit einer adäquaten Menge von Erythrozyten in eine Agarschicht inkorporiert: Jede lymphoide Zelle, die lytische Antikörper sezerniert, verursacht bei den sie umgebenden roten Blutzellen eine Sensibilisierung. Nach Zugabe von Komplement entstehen durch Lyse der sensibilisierten Zellen Plaques. Ein "Plaque" imponiert als ein blasses, durch lysierte Erythrozyten entstandenes Areal in der Agarschicht, in dessen Mitte sich die antikörperbildende Zelle befindet. Dieser Hämolysehof hebt sich gut von den noch intakten Erythrozyten der Umgebung ab.

Mit dieser Technik können nur solche Zellen, die Antikörper produzieren und Komplement binden und so die Erythrozyten direkt lösen, dargestellt werden. Mit wenigen Ausnahmen gehören diese Antikörper der IgM-Klasse an. Die Zellen, die diese Antikörper produzieren, werden als direkte Plaque-Forming-Cells bezeichnet.

4 Tage nach Sensibilisierung mit Hammelerythrozyten entstehen die "schnellen" IgM-Antikörper. Diese IgM-Pentamere können als ein einzelnes Molekül mit Komplement reagieren und einen Erythrozyten lysieren. Man spricht von sogenannten "one hit theory".

Die Majorität der humoralen Antikörper gehört jedoch der IgG bzw. der IgA-Klasse an, die nur in geringem Ausmaß Komplement fixieren können. Wird ein solcher einzelner Antikörper, der auf der Oberfläche einer Targetzelle liegt, durch einen zusätzlichen Anti-Globulin-Antikörper besetzt, so sind sie gemeinsam in der Lage, Komplement zu aktivieren und die Zelle zu lysieren (17).

Die Zellen, die in diesem Fall für die Plaque-Formation verantwortlich sind, werden deshalb als indirekte Plaque-Forming-Cells bezeichnet. Mit spezifischen Antiglobulinseren kann man nun die verschiedensten Plaque-Forming-Zellen

unterscheiden. In Mäusen können so z.B. IgM, IgG 1, IgG 2a oder 2b oder Kappa und Lambda-Ketten sezernierende Plaque-Forming-Zellen unterschieden werden (52,60).

Ursprünglich wurde der Plaque-Forming-Assay nur für Mäuse ausgearbeitet. Inzwischen gibt es viele Beschreibungen über Nachweis antikörpersezernierender Zellen bei Hamstern (55), Schweinen (9) und Hunden (34).

Während gewöhnlich Milzzellen als antikörpersezernierende Zelle herangezogen wurden, liegen Berichte über Verwendung von Hepatozyten (21), Lymphknotenzellen (59) und Versuche mit peripheren Lymphozyten (2, 49) vor.

Die Variation des Testes kann noch erweitert werden, indem im "direkten Test" verschiedenste Proteine auf Erythrozyten fixiert werden, die dann als Targetzellen funktionieren. Dies wird als passive Plaque-Technik bezeichnet. Dazu können Human- γ -Globulin (26), Rinderserumalbumin (12) und ähnliche Proteine herangezogen werden.

Versuche mit unterschiedlichen Targetzellen im direkten Plaque-Forming-Test sind selten, meist werden Schafererythrozyten (32,33,35,36), selten Pferdeerythrozyten (25) und Kaninchenerythrozyten (31) als Targetzellen verwendet.

Die Methode des Plaque-Forming-Assay ist geeignet, die Entwicklung der Immunität einer Spezies im Laufe des Lebens zu verfolgen bzw. die Ontogenese von antikörperbildenden Zellen zu verfolgen (55).

In vielen Untersuchungen wurde der Mechanismus der Antikörpersekretion untersucht. Präformierte Antikörper bildende Zellen kommen in älteren Mäusen vor, während sie in jungen Mäusen noch selten sind. Durch Injektion von Endotoxin bzw. Pertussis-Vakzine (19) oder BCG (23) können solche antikörperproduzierende Zellen z.B. unspezifisch stimuliert und ihre Zahl vermehrt werden. Andererseits kann die Antikörperformation z.B. in Mäusen, durch Poly I:C, einer synthetischen doppelsträngigen RNA, die aus den Polyribonukleinsäuren Inosin und Zytodin zusammengesetzt sind und einen star-

ken Interferon-Induzer darstellen, angeregt werden. Tiere, die mit Poly I:C behandelt wurden, weisen eine lineare Zunahme mit der Erhöhung der Dosis von Poly I:C in den hämolytischen Plaques auf (54,58). Eine Unterdrückung der primären und sekundären Immunantwort gelingt auf der anderen Seite durch ALS (31,46) bzw. durch Ganzkörperbestrahlung.

Unter Berücksichtigung der bestehenden Methoden wurde versucht, den Test an Hundeerythrozyten als Targetzellen bzw. an Schafererythrozyten, die mit Pferde- γ -Globulin beschichtet waren, anzugleichen.

Eine solche Variation war wünschenswert, da so eine Immunantwort gegen unterschiedliche Erythrozyten von Caniden, z.B. Fuchs-Hund-Wolf (24) zur Identifizierung der Oberflächenantigene bzw. der roten Blutgruppen möglich wäre und weil die Sensibilisierung von Hunden nach Therapie mit Pferde-Anti-Human- γ -Globulin nachgewiesen werden könnte. Die Ursachen für die Abweichung im Versuchsablauf im direkten Test bei der Verwendung der Hundeerythrozyten als Targetzellen dürften 1. in der unterschiedlichen Größe der Erythrozyten und 2. in den unterschiedlichen Milieubedingungen, d.h. pH Optimum für Hundeerythrozyten 7,6 im Vergleich zu pH 7,4 bei Schafererythrozyten begründet sein.

Eines unserer Anliegen war es, anstelle von Mäuselymphozyten Hundelymphozyten als Effektorzellen in den direkten Plaque-Test einzusetzen. Die Gründe für die schlechten Ergebnisse sind unter anderem in der nicht optimalen Sensibilisierung der Hunde gegen Hammelerythrozyten, weiterhin in der mangelnden lytischen Potenz der nach der Ficoll-Methode aus dem peripheren Blut separierten Hundelymphozyten und schließlich noch in dem zur Lyse verwendeten, vielleicht nicht optimalen Komplement zu suchen.

Die direkte Methode wurde von Pasanen und Makelä 1969 zur "passiven" Plaque-Technik modifiziert (39,48). Vor allem Makelä konnte zeigen, daß während der Sekundärantwort Kaninchen gegen Antigen ebenso reagieren wie in der direkten Methode, nur daß die Indikatorzellen mit dem spezifischen Antigen gekoppelt sind, d.h., die Targetzelle-Erythrozyt

wird mit dem gesuchten Antigen überzogen, der IgM-Antikörper greift wie beim direkten Plaque-Test den mit Antigenen beladenen Erythrozyten direkt an (Molekül/Molekül=one hit theory). Bei dieser Methode liegen die einzigen Schwierigkeiten darin, daß durch die Antigenimprägnierung, die sich auf der Erythrozytenoberfläche abspielt, die Brüchigkeit des Erythrozyten exzessiv gesteigert werden und damit die Bereitschaft zur Lyse durch Komplement verändert sein könnte.

Als kuppelndes Agens wurde nach einer Anregung von Sweet and Welbon (56) Chromlorid ($\text{CrCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) verwendet, da hierbei im Verhältnis zur ECDI (1 Äthyl-2-(3 Dimethylaminopropyl) carbodiimid HCl) Methode (Golub et al. (22,37)) oder zur Bis-diazo-benzidin (BDB) Methode, von Kapp and Ingraham (38) entwickelt, am wenigsten Protein verbraucht wird. Außerdem handelt es sich um eine einfache und schnelle Methode!

Die Verwendung dieser "passiven" Methode war nötig, um die gegen Pferde IgG bzw. ALG sensibilisierten bzw. toleranten Hunde auf Antikörperbildung gegen Pferde IgG bzw. ALG zu testen.

b. Nachweis einer immunologischen Toleranz mittels des Plaque-Forming-Assay

Um die Überlebenszeit von Organtransplantaten zu verlängern, wurde versucht, immunologische Toleranz entweder gegen die Histokompatibilitätsantigene des Transplantates (7) bzw. gegen lösliche Proteine (12, 22, 18) zu induzieren. Damit wurde es möglich, mit hochgereinigten IgG-Fractionen von Immunseren wie z.B. ALG oder AMG die Abstoßungsreaktion von Transplantaten besser zu beherrschen.

Immunologische Toleranz ist definiert als ein spezifisch refraktäres Stadium der Immunantwort gegen ein Antigen, eine Situation, die aus einem früheren Kontakt mit demselben Antigen entstanden ist (27,28,29,40,41).

Seit kurzem ist bekannt, daß alle Stadien der experimentell

induzierten Toleranz nicht durch ein und denselben Mechanismus erzeugt werden, sondern über verschiedene Wege entstehen.

Ein möglicher Mechanismus ist die von Burnett 1949 postulierte Hypothese der "clonal selection" (8).

Diese natürliche Toleranz gegen die körpereigenen Antigene, die bereits vor der Geburt und damit zur Zeit der immunologischen Reifung vorhanden war, wird auch als zentrale "unresponsiveness" bezeichnet. Vom Stadium dieser zentralen "unresponsiveness" muß erwartet werden, daß die folgenden drei Eigenschaften erfüllt sind:

1. Die Abwesenheit von spezifischen Antigen-bindenden B oder T-Zellen.
2. Wirkliches Fehlen von Immunität während der induktiven Periode der Toleranz.
3. Bestehenbleiben der Toleranz auch bei erneuter Antigenzufuhr.

Im Gegensatz zur zentralen "unresponsiveness" existieren andere Formen der experimentell induzierten Toleranz, in welchen immunkompetente Zellen anwesend sind, jedoch nicht stimuliert werden können, so auch keine nachweisbare Immunantwort vorliegt. In diesem Fall werden die kompetenten Zellen durch entsprechende regulierende Mechanismen unterdrückt. Man bezeichnet dies als "periphere Inhibition". Ein Beispiel dafür ist die Toleranzinduktion gegen Pneumokoken-Polysaccharide und Lipopolysaccharide von gramnegativen Bakterien. Beide Antigene sind Thymus-abhängig und persistieren für lange Zeit im Gewebe. Wenn Mäuse mit solchen Toleranz-induzierenden Dosen des Antigens injiziert werden, werden die Tiere spezifisch refraktär gegen die folgenden Injektionen, d.h. sie besitzen kompetente Zellen, die das Antigen tolerieren. Dies kann demonstriert werden, indem Milzzellen auf normal-reagierende Tiere, die zuvor tödlich bestrahlt wurden, übertragen werden (30,53). Es darf heute angenommen werden, daß der regulierende Mechanismus seinerseits durch sogenannte "Suppressor-T-Zellen" reguliert wird (24).

c. Transplantationstoleranz

Die tolerogenen Eigenschaften werden mit zunehmender Komplexität der Oberflächenstruktur intakter Gewebszellen vermindert. Günstige Voraussetzungen für eine erfolgreiche Toleranzinduktion und damit für eine Nichtabstoßung des Organtransplantats durch den Empfänger bestehen, wenn Spender und Empfänger nahe verwandt sind. Eine solche günstige Spender-Empfänger-Konstellation wird durch die Bestimmung der Histokompatibilitätsantigene gefunden.

Kann ein beständiger Blutzellchimärismus geschaffen werden, so wird eine komplette Transplantationstoleranz - auf den Zellsponder bezogen - erreicht. Dies gelang 1953 Billingham et al. (4, 5) durch Injektion von Milz- und Leberzellen des Mäusestammes A in CBA-Embryonen. Durch diese Vorbehandlung wurde die Überlebenszeit später transplantiert Hautstücke von normalerweise 11 Tagen auf über ein Jahr verlängert.

Der Histokompatibilitätslocus H_2 stellt bei Mäusen eine genetische Barriere dar. Toleranzinduktion ist nur während der immun-immaturen Phase möglich, und zwar zwischen Tieren mit oder ohne H_2 -Locus. Bei stark inkompatiblen Mäusestämmen wird eine 20-fach höhere Zellzahl als im schwach inkompatiblen System zur Erzeugung der Immuntoleranz benötigt, wie Brent und Gowland (7) zeigten. Santos und Owens (50, 51) erzeugten Langzeitchimärismus zwischen H_2 -inkompatiblen erwachsenen Mäusen und Ratten durch Knochenmarkszelltransplantation 24 Stunden nach Verabreichung einer subletalen Cyclophosphamiddosis. Auf diese Weise wurden Hautstücke zwischen Zellsponder und -empfänger, die später transplantiert wurden, nicht abgestoßen.

Eine weitere Methode zur Erzeugung einer host-versus-graft und graft-versus-host-Toleranz besteht in der Ganzkörperbestrahlung des Empfängers mit einer hohen Strahlendosis (1, 43).

Während die Chancen zur Erzielung einer Immuntoleranz im homogenen System gut sind, bestehen dagegen im xenogenen

System nur geringe Aussichten, mit intakten Zellen Toleranz zu induzieren. Allenfalls kurzzeitige und dann auch meist nur partielle Toleranz kann bei phylogenetisch eng verwandten Tierspezies erzeugt werden. Wenige erfolgreiche Experimente sind bis jetzt zwischen Spezies mit entfernter stammesgeschichtlicher Verwandtschaft gelungen (28, 56). So konnten Dietrich und Dukor (11) in Mäusen Toleranz gegen Hammelerythrozyten unter Verwendung von Cyclophosphamid induzieren.

d. Toleranzinduktion im erwachsenen Organismus

Zahlreiche Mitteilungen über erfolgreiche Toleranzinduktion mit xenogenen Serumproteinen im immun-immaturen Individuum erschienen seit den Arbeiten von Dresser (13, 15, 16) sowie Battisto und Miller (3) im Jahre 1962. Vor allem Dresser (15, 16) konnte zeigen, daß in erwachsenen Mäusen Toleranz gegen Rinder- γ -Globulin erzeugt werden kann. Dazu ist es notwendig, daß das Tolerogen in aggregatfreier Form verabreicht wird. Anderenfalls erhöhen nach Dresser (16) die Proteinaggregate die Immunogenität über eine Steigerung des Adjuvanseffektes, der die Immunantwort lediglich qualitativ beeinflusst (6, 10, 16). Native Proteine, die nur einen geringen Adjuvanseffekt besitzen, sind aus diesem Grunde zur Toleranzinduktion besonders geeignet. Als nichtimmunogene Antigene (14) werden Serumproteine bezeichnet, die nur mit Adjuvans in verschiedenen Tierarten eine Immunantwort auslösen können, in geeigneter Dosis ohne Adjuvans daher stets Toleranz induzieren können. Dies wurde im Rinder-IgG-Maus-Modell nachgewiesen. Beim Hund (27, 40) und beim Menschen (41) soll Pferde IgG die gleichen Eigenschaften besitzen.

Von Mitchison (44, 45) wurden die Begriffe "low-und high-zone-tolerance" geprägt. Er konnte im Rinderalbumin-Maus-System zeigen, daß innerhalb zweier Dosisbereichen Toleranz entsteht. Im dazwischenliegenden Dosisbereich antworten die Tiere mit Antikörperproduktion.

Ein weiterer Weg, Toleranz gegenüber starken Antigenen zu induzieren, verlangt die Herabsetzung der Reaktivität des Immunsystems z.B. durch Ganzkörperbestrahlung. Dies bewiesen Dixon und Maurer (12) im Versuch mit erwachsenen Kaninchen. Ohne Bestrahlung war die Toleranz nur partiell. Toleranz kann andererseits gegenüber starken Antigenen erzeugt werden, indem das Antigen chemisch aufgespalten wird und die entstehenden Bruchstücke als Tolerogen verabreicht werden. Dies demonstrierten Friedman und Gaby (20) mit Shigella-Antigen an Hühnern, Parish und Ada (47) mit bromzyangespaltenen Flagellin an Ratten. Gegenüber L-Asparaginase konnte ebenfalls eine partielle Toleranz in erwachsenen Ratten nach intravenöser Vorbehandlung der Tiere mit L-Asparaginasebruchstücken erzielt werden (29), wobei Bromzyan ebenfalls zur Fragmentierung von L-Asparaginase verwendet wurde.

e. Transfer von sensibilisierten bzw. toleranten Zellen auf normale Empfänger

Während im Falle einer zentralen Toleranz durch eine Übertragung von normalen sensibilisierten Zellen an Toleranzstadium geändert werden kann, sollte für unsere Zwecke umgekehrt mittels Übertragung toleranter und sensibilisierter Zellen der sichere Nachweis für eine Immunantwort gegen xenogenes Protein erbracht werden.

Dazu wurden isogene Mäuse einerseits mit Pferde IgG sensibilisiert bzw. nach dem angegebenen Schema tolerant gemacht. Die auf diese Weise behandelten Spendermäuse wurden getötet und ihre Milzzellen auf isogene Mäuse, die tags zuvor tödliche bestrahlt wurden, übertragen. Nach der Rekonstruktion der Empfängermäuse durch das isogene Transplantat wurde die immunologische Reaktion durch Boosterung bzw. Challenge getestet und diese Empfängermäuse nun im Jerne-Test auf Toleranz bzw. Sensibilisierung getestet. Es mußte angenommen werden, daß Mäuse, die Milzzellen von toleranten Spendern bekamen, keine Plaque-Forming-Zellen besitzen,

während Milzzellen immunisierter Spender entsprechende Zahlen von antikörpersezernierenden Lymphozyten entwickelten.

Die Ergebnisse dieser überaus schwierigen und langwierigen Versuche bedürfen noch weiterer Untersuchungen. Die geringe Immunogenität von Pferde IgG (27, 40) muß für die nicht ausreichende Sensibilisierung in diesem System verantwortlich gemacht werden. Die Anzahl der Tiere, bei denen Toleranz induziert werden konnte, entspricht etwa den Zahlen, die aus der Literatur bekannt sind (44, 45). Die Gründe für die niedrigen Plaquezahlen, die im "passiven" Test nach Jerne gegen die mit Pferde IgG markierten Schaferythrozyten gefunden wurden, entsprechen einigen Angaben aus der Literatur (25, 31), konnten aber nicht befriedigend reproduziert bzw. verbessert werden. Die Variationen im Test deuten daraufhin, daß es sich um eine geringe Sensibilisierung der Mäuse handeln könnte bzw. daß die Beschichtung der Erythrozytenoberfläche mit dem gewünschten Antigen nicht optimal ausgeführt werden konnte.

In weiteren Untersuchungen muß geklärt werden, ob eine Sensibilisierung bzw. Toleranzinduktion gegen Pferde IgG auch im direkten Plaque-Test mit Pferdeerythrozyten als Targetzellen einfacher und sicherer nachgewiesen werden kann.

E. Zusammenfassung:

Es wurde in der Arbeit versucht, zwei immunologische Vorgänge zu kombinieren:

1. Der Nachweis antikörperbildender Zellen durch die "direkte" und "indirekte" Methode sowie die "passive" Methode im Jerne-Test, wobei hier im System der Maus gearbeitet wurde.

2. Die Induktion einer immunologischen Toleranz.

Während im Originalsystem - Schafererythrozyten als Antigen und Maus als Immunisierungstier - keine Schwierigkeiten auftraten, gab es Schwierigkeiten bei der Angleichung des Testes an Hundeerythrozyten bzw. Pferdeerythrozyten als Targetzellen. Mit peripheren Lymphozyten vom Hund konnten keine Plaques erzielt werden. Mit Milzzellen von Hunden, die gegen Schafererythrozyten immunisiert worden waren, gab es nur unzureichende Ergebnisse. Ein Nachweis von Toleranzinduktion bzw. Sensibilisierung gegen Pferde IgG bei Mäusen sollte durch Transferversuche dargestellt werden. Während die Transplantation von Milzzellen auf bestrahlte Tiere zur Zufriedenheit ausgeführt werden konnte, scheint die Produktion von antikörperbildenden Zellen aus den Spender-tieren nicht der Rekonstruktion des Knochenmarks der Empfänger parallel zu gehen.

Es erhebt sich daher die Frage, ob diese Methode der "passiven" Plaqueformation für solche Versuche gerechtfertigt ist.

F. Literatur:

1. Argyris, B.F.: Adoptive tolerance transferred by bone marrow, spleen, lymphnode or thymus cells.
J. Immunol. 95 (1966), 273.
2. Baenkler, H.-W. (1972) Circulating Plaque-Forming Cells after Transfusion. Acta Haemat. 47:233-237.
3. Battisto, J.R., J.Miller: Immunological unresponsiveness produced in adult guinea pigs by parenteral introduction of minute quantities of hapten or protein antigen. Proc. Soc.exp. Biol. (N.Y.) 111 (1962), 111.
4. Billingham, R.E., L. Brend, P.B. Medawar: Actively acquired tolerance of foreign cells.
Nature (Lond.) 172 (1953), 603.
5. Billingham, R.E., L.Brent, P.B. Medawar: Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Actively acquired tolerance. Phil. Trans. B 239 (1956), 357.
6. Biro, C.E., G.Guadalupe: The antigenicity of aggregated and aggregate-free human-globulin for rabbits.
Immunology 8 (1965), 411.
7. Brent, L., G. Gowland: Cellular dose and age of host in the induction of tolerance. Nature (Lond.) 192 (1961), 1265.
8. Burnet, F.M., F. Fenner: The production of Antibodies.
Melbourne, Australia: MacMillan Co., Ltd. 1949.
9. Buschmann, H. and Schumann, H. (1971): A Kinetic and Genetic Study of the Cellular and Humoral Immune Response in Pigs after Immunisation with Sheep Erythrocytes.
Z. Immun.-Forsch. Bd. 141, S. 211-222.

10. Claman, H.N.: Tolerance to a protein antigen in adult mice and the effect of nonspecific factors. *Immunol.* 91 (1963), 833.
11. Dietrich, F.M., P.Duktor: Further studies on chemically induced tolerance to heterologous red cells in mice. *Int. Arch. Allergy* 36 (1969), 91.
12. Dixon, F.J., P.H.Maurer: Immunologic unresponsiveness induced by protein antigens. *J.exp.Med.* 101 (1955), 245.
13. Dresser, D.W.: Acquired immunological tolerance to a fraction of bovine gammaglobulin. *Immunology* 4 (1961) 13.
14. Dresser, D.W.: The effectiveness of lipid and lipophilic substances as adjuvants. *Nature (Lond.)* 191 (1961), 1169.
15. Dresser, D.W.: Specific inhibition of antibody production. I. Proteinoverloading paralysis. *Immunology (Lond.)* 5 (1962), 161.
16. Dresser, D.W.: Specific inhibition of antibody production. II. Paralysis induced in adult mice by small quantities of protein antigen. *Immunology (Lond.)* 5 (1962), 378.
17. Dresser, D.W. and Wortis, H.H. (1965): Use of an anti-globulin serum to detect cells producing antibody with low haemolytic efficiency. *Nature* 208, 859.
18. Feldman, M., E.Diener: Antibody mediated suppression of the immune response in vitro. III. Low zone tolerance in vitro. *Immunol.* 21 (1971), 387.
19. Finger, H. and Hof, H. (1972): Influence of pertussis Vaccine and Bacterial Endotoxin on Blood Leukocyte Counts and Numbers of Pre-Existing Antibody-Forming Cells in Aged Mice. *Gerontologia* 18: 63-76.

20. Friedman, H.W., L. Gaby: Immunological unresponsiveness to Shigella antigens in chickens.
J. Immunol. 84 (1960), 441.
21. Garvey, J.S. and Linker-Israeli, M. (1972: Anti-SRBC Plaque-Forming Cells in Liver, Spleen and Hepatocyte Cell Suspensions of Rabbits and Mice. Immunol. Communications, 1 (5), 507-521.
22. Golub, E.S., Mishell, R.I., Weigle, W.O. and Dutton, R.W. (1968): A modification of the hemolytic plaque assay for use with protein antigens. J. Immunol. 100, 133.
23. Gryscek, G. (1975): Einfluß von BCG auf die Produktion Antikörper bildender Zellen in der primären und sekundären Immunantwort gegen Schaferythrozyten bei der Maus. Acta biol.med.germ., Band B4, Seite 155-161.
24. Ha., T.-Y. and B.H.Waksman (1973): Role of the Thymus in Tolerance. X. "Suppressor" Activity of Antigen-Stimulation Rat Thymocytes Transferred to Normal Recipients. J. of Immunology, Vol. 110, No.5, p.1290-1299.
25. Hege, J.S. and Cole, J.L. (1967): Antibody Plaque-Forming Cells in Unsensitized Mice. Specificity and Response to Neonatal Thymectomy, X-Irradiation and PIHH. J. of Immunology- Vol. 99, No. 1.
26. Hege, J.S. and Epstein, W.V. (1971): Antibody Plaque-Forming Cells in Mice Immunized with Human γ Globulin. J. of Immunol. Vol. 106, No. 3.
27. Hopf, U., W.Land, J.Seifer, A.Fateh-Moghadam, W.Brendel: Induction of tolerance of horse-gamma-globulin fractions in adult dogs. Brit.J.Surg. 56 (1969), 617.

28. Hopf, U., J. Seifert, W. Land, G. Lob, W. Brendel: Versuche zur Toleranzinduktion mit Blutzellen im Hund-Ratten-System. 2. Tagg. der Ges.f.Immunol., Wien 1970 (Abstr.).
29. Hopf, U., W. Land, H. Furthmayer, R. Timpl, W. Brendel: Versuche zur Induktion einer immunologischen Toleranz gegen L-Asparaginase von E.Coli.
Klin.Wschr. 49 (1971), 711.
30. Howard, J.G. (1972): Cellular Events in the Induction and Loss of Tolerance to Pneumococcal Polysaccharides, Transpl. Rev. Vol. 8. 50-75.
31. Hrubá, A., Paluska, E. and Krecek, M. (1972): Effect of Antilymphocyte Serum against Lymphocytes of Immunized Rats on Antibody Formation to Erythrocytes (guinea pig erythrocytes/human erythrocytes/primary response/secondary response). Folia Biologica (Praha) 18: 380-384.
32. Ingraham, J.S. (1963): Identification individuelle des cellules productrices d'anticorps par une reaction hemolytique locale. C.R.Acad.Sci. 256, 5005.
33. Ingraham, J.S. and Bussard, A. (1964): Application of a localized hemolysin reaction for specific detection of individual antibody forming cells. J.Exp.Med. 119, 667.
34. Jacoby, R.O., Dennis, R.A., Griesemer, R.A. (1969): Development of Immunity in Fetal Dogs: Humoral Responses. American J. of Veterinary Research.
35. Jerne, N.K. and Nordin, A.A. (1963): Plaque formation in agar by antibody-producing cells. Science 140, 405.
36. Jerne, N.K., Nordin, A.A. and Henry, C. (1963): The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells. Cell-Bound Antibodies, ed. Amos, B. and Koporowsky, H., p. 109. Wistar Institute Press.

37. Kaplan, A.M. and Freeman, M.J. (1968): Enumeration of cells synthesizing antiprotein antibodies by a modified hemolytic plaque assay. *Proc. Soc.Exp.Biol.Med.* 127, 574.
38. Kapp, J.A. and Ingraham, J.S. (1970): Anti-protein plaque-forming cells detected with high efficiency by the use of red cells coupled to bovine serum globuline through bis-diazo-benzidine. *J.Immunol.* 104, 1039.
39. Kishimoto, S. Tsuyuguchi, I. and Yamamura, Y. (1968): The immune response to hapten-azo bovine serum albumin as detected by hemolytic plaque technique. *Int.Arch.Allergy* 34, 544.
40. Land, W., J. Seifert, A. Fateh-Moghadem, U. Hopf, W. Brendel: Induktion einer Immuntoleranz gegen Pferdeserum IgG beim erwachsenen Hund. *Z.ges.exp.Med.* 151 (1969), 117.
41. Land, W., Brendel, W., Hopf, U. und Seifert, J.: Versuch zur Induktion einer immunologischen Toleranz gegen Pferde IgG am Menschen. *Klin.Wschr.* 48, (1970), 241.
42. R. Laskov, R. Rabinowitz, M. Schlesinger (1973): Antigenic Characterization of Murine Rosette and Plaque-forming Cells. *Immunol.* 24, 939.
43. Mathe, G., J. L. Amiel, L. Schwarzenberg, A. Cattani, M. Schneider: Hematopoietic chimera in man after allogeneic (homologous) bone marrow transplantation: Chimerism induced specific tolerance and possible antileukemic effect. *Blood* 25 (1965), 179.
44. Mitchison, N.A.: Induction of immunological paralysis in two zones of dosage. *Proc.roy.Soc.B* 161 (1964), 275.
45. Mitchison, N.A.: The dosage requirement for immunological paralysis by soluble proteins. *Immunology (Lond.)* 15 (1968), 509.

46. Morgan, G.W., Esposito, V.M. and Jarboe, W. (1973): Reduction of Antibody Plaque-Forming Cells by Allo-geneic Antilymphocyte Serum. *Infection and Immunity*, Vol. 7, No. 3, p. 504-506.
47. Parish, C.R., G.L. Ada: The tolerance inducing properties in rats of bacterial flagelline cleaved at the methionine residues. *Immunology (Lond.)* 17 (1969), 153.
48. Pasanen, V.J. (1971) and Mäkelä, O. (1969): Effect of the number of haptens coupled each erythrocyte on haemolytic plaque formation. *Immunology* 16, 399.
49. Rabin, B.S. and Rose, N.R. (1973): Selective Release of Antibody Forming Cells into the Blood. *Cellular Immunology* 7, 389-395.
50. Santos, G.W., A.H. Owens: Syngeneic and Allogeneic Marrow Transplants in the Cyclophosphamide Pretreated Rat. In J. Dausset, J. Hamburger, G. Mathe (Hrsg.) *Advances in Transplantation. Proceedings of the first Internat. Congr. of the Transplantation Society, Paris 27-30.6.1967.*
51. Santos, G.W., A.H. Owens: Allogeneic marrow transplants in cyclophosphamide treated mice. *Transplant. Proc.* 1 (1969), 44.
52. Sell, S., Park, A.B. and Nordin, A.A. (1970): Immunoglobulin classes of antibody-forming cells in mice. I. Localized hemolysis-in-agar plaque forming cells belonging to five immunoglobulin classes. *J. Immunol.* 104, 483.
53. Sjöberg, O., M.D. (1971): Antigen-Binding Cells in Mice Immune or Tolerant to *Escherichia Coli* Polysaccharide. *J. of Exp. Medicine*, Vol. 133, p. 1015-1025.

54. Sollinger H.W., C.Hammer, w.Schmidt, Ch. Chaussy und W. Brendel: 50. Nachweis der T-Zell aktivierenden Funktion von sythetischen Polynukleotiden. Langenbecks Arch.Chir.Forum 1975, Seite 235-237.
55. Solomon,J.B., Leiper,J. and Reid,T.M.S. (1972): Ontogeny of Haemolytic Plaque-Forming Cells in the Hamster; the Response to Sheep and Mouse Erythrocytes. Immunology, 22, 63.
56. Southam, Ch.M., Qu.S.Dizon: Rejection of human cancer transplants by tolerant rats following treatment with allogeneic lymphoid cells. Cancer Res. 29 (1969),1428.
57. Sweet,G.H. and Welbonr, F.L. (1971): Use of chromium chloride as the coupled agent in a modified plaque assay. Cells producing anti-protein antibody. J.Immunol. 106, 1407.
58. Turner,W., Chan,S.P. and Chirigos,M.A. (1970): Stimulation of Humoral and Cellular Antibody Formation in Mice by Poly I: C. Proceedings of the Society for Exp.Surgery Nr. 133.
59. Weissman,I.L., Peacock,M. and Eltringham,J.R. (1973): Regional Lymph Node Irradiation: Effect on Local and Distant Generation of Antibody Forming Cells. J. of Immunol. Vol. No. 5.
60. Wortis,H.H., Dresser,D.W. and Anderson,H.R. (1969): Antibody production studied by means of the localized haemolysis in gel (LHG) assay. III. Mouse cells producing five different classes of antibody. Immunol. 17, 93.

Herrn Professor Dr. G. Heberer möchte ich für Überlassung des Arbeitsplatzes an seiner Klinik danken.

Für die Anregung zu dieser Arbeit und für die großzügige Unterstützung danke ich besonders Herrn Dr.Dr.C. Hammer und Herrn Professor Dr.W. Brendel, die mir auch bei der kritischen Durchsicht wertvolle Ratschläge gaben.

Frl. G. Brons und Frl. G. Höbl, die mir in technischen Belangen hilfreich zur Seite standen und mir bei der Anfertigung der Abbildungen halfen, danke ich ebenfalls.

Lebenslauf

Geboren: 18.2.1949

in: München

Eltern: Theodor Schmidt, Beamter, und
Henriette Schmidt, geb. Hailer

Schul Ausbildung: 1955-1957 Volksschule an der Wörthstr./
München
1957-1959 Volksschule Werdenfelsstr./
München
1959-1962 Erasmus-Grasser-Gymnasium/
München
1962-1968 Klenze-Gymnasium/München
Abitur 1968 in München

Studium: 1968-1970 Vorklin.Semester, Universität
Erlangen
Vorphysikum: Sommer 1969
1970-1971 Vorklin.Semester, Universität
München
Physikum: Frühjahr 1971
1971-1974 Klin.Semester, Universität
München
Staatsexamen nach dem Wintersemester
1973/74
Famulaturen an der Chirurgischen Abtei-
lung des städt. Krankenhauses München-
Harlaching

Medizinalassistentenzeit:
Vom September 1974 bis Februar 1975 am
Institut für Chirurgische Forschung an
der Chirurgischen Univ.-Klinik München.
Von März bis August 1975 auf einer In-
ternen Abteilung des Kreiskrankenhauses
München-Perlach.

Familienstand: ledig.

